



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de la capacidad antagonista y
caracterización preliminar de compuestos
antimicrobianos del actinomiceto marino cepa 13a-2
frente a microorganismos β -lactámico-resistentes de
origen hospitalario**

TESIS

**Para optar el Título Profesional de Biólogo Microbiólogo
Parasitólogo**

AUTOR

Mirko David LINO NAVARRO

ASESOR

Jorge LEÓN QUISPE

Lima, Perú

2014



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Lino, M. (2014). *Evaluación de la capacidad antagonista y caracterización preliminar de compuestos antimicrobianos del actinomiceto marino cepa 13a-2 frente a microorganismos β -lactámico-resistentes de origen hospitalario*. Tesis para optar el título Biólogo Microbiólogo Parasitólogo. Escuela Académico Profesional de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Dedico esta tesis a nuestro Dios todopoderoso, por intermedio de nuestro hermano y Señor Jesucristo por ser fuente de toda energía, magia y conocimiento, por la familia que me ha regalado, por levantarme cada mañana y enseñarme a perseverar, por enseñarme a laborar con pasión y fe, por su compañía todos los días de mi vida, por su amor incondicional y por lo que nos tiene preparado.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres Damián y Lucy por traerme a este mundo, formarme, enseñarme a tener fortaleza y ayudarme a ser mejor cada día de mi vida.

A mis 7 hermanos Agustín, Félix, William, Martin, Milagros, Liz y Rosita por ser los amigos, guardianes y acompañantes de nuestras travesías desde pequeños, porque me guían y motivan a dar lo mejor.

A mi asesor Mg. Jorge León Quispe, por la oportunidad y facilidades de aprender y experimentar en su laboratorio, por todas sus críticas constructivas en los ensayos, que nos permiten encontrar nuevas soluciones.

A profesora Mónica Huamán, por las cepas patógenas donadas y por todos sus consejos y enseñanzas dentro y fuera de las aulas

A todos los integrantes del laboratorio de Ecología Microbiana que están y los que partieron, por todos los momentos compartidos y sus enseñanzas.

A los siguientes profesores de UNMSM, por sus buenos consejos y ambientes prestados: Pedro Castellanos, Libertad Alzamora, Erasmo Colona, Enrique Escobar, Martha Valdivia, Elena Quillama, Abad Flores, Olga Bracamonte, Patricia Woll, Mercedes Soberon, Dora Velásquez y Julio Santiago.

Al Dr. Emilio Marguet por la identificación molecular de la cepa 13A-2.

A Mg. Giovanna Sotil y al Quím. Lenin Flores de IMARPE.

Al Blgo. William Quispe y Dr. R. López del Instituto Nacional de Salud (INS)

A las personas que la vida me permito conocer dentro y fuera de la universidad amigos, compañeras, compañeros de aula y personal administrativo.

Al vicerrectorado de Investigación (VRI) –UNMSM y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) por sus financiamientos para la realización y exposición de la presente tesis.

INDICE GENERAL

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Phylum Actinobacteria. Generalidades	5
2.2 El género <i>Streptomyces</i>	7
2.2.1 Generalidades	7
2.2.2 Organización genómica	8
2.2.3 Ciclo de vida	9
2.2.4 Moléculas señal, regulación y control genético	12
2.2.5 Metabolismo secundario en <i>Streptomyces</i>	13
2.2.6 Producción de metabolitos secundarios en <i>Streptomyces</i> .	14
2.3 Actinomicetos de ambientes marinos	15
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1 Objetivo general	19
4.2 Objetivos específicos	19
5. MATERIALES	20
5.1 Material biológico	20

6. METODOLOGÍA	21
6.1 Comportamiento cultural y caracterización fenotípica del Actinomiceto 13A-2.	21
6.2 Pruebas de actividad multienzimática	21
6.3 Pruebas de antagonismo primario frente a bacterias estándar ATCC y selección del mejor actinomiceto	22
6.4 Pruebas de Antagonismo del actinomiceto 13A-2 frente a <i>E.coli</i> ATCC 25922 y <i>E.coli</i> ATCC 8739 usando diferentes medios de cultivo.	23
6.5 Pruebas de antagonismo del actinomiceto seleccionado 13A-2 frente a bacterias β -lactámico-resistentes de origen hospitalario.	23
6.6 Identificación genotípica de la cepa 13A-2	24
6.7 Caracterización preliminar de compuestos antibacterianos	25
6.7.1 Proceso Fermentativo.	25
6.7.2 Evaluación de actividad antibacteriana en los sobrenadantes.	26
6.7.3 Extracción y caracterización de compuestos antimicrobianos	26
A) Búsqueda de compuestos antibacterianos no péptidos.	27
A.1 Extracción de compuestos bioactivos a partir de sobrenadantes.	27
A.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos.	27

B) Búsqueda de compuestos antibacterianos de naturaleza Peptídica	28
B.1 Evaluación cualitativa de proteínas	28
B.2- Cuantificación de proteínas.	28
B.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)	29
6.7.4 Caracterización de los antimicrobianos utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	29
7. RESULTADOS	31
7.1 Comportamiento cultural y caracterización fenotípica del actinomiceto 13A-2.	31
7.2 Pruebas de actividad multienzimática	34
7.3 Pruebas de antagonismo primario del actinomiceto 13A-2 frente a bacterias estándar ATCC	40
7.4 Pruebas de Antagonismo del actinomiceto 13A-2 frente a <i>E.coli</i> ATCC 25922 y <i>E.coli</i> ATCC 8739 usando diferentes medios de cultivo.	42
7.5 Pruebas de antagonismo del actinomiceto seleccionado 13A-2 frente a bacterias β -lactámico-resistentes	44
7.6 Identificación genotípica de la cepa 13A-2	49
7.7 Caracterización preliminar de compuestos antibacterianos	50
7.7.1 Proceso Fermentativo.	50
7.7.2 Evaluación de actividad antibacteriana en los sobrenadantes.	50

7.7.3 Extracción y caracterización de compuestos antimicrobianos	52
A) Búsqueda de compuestos antibacterianos no péptidos.	52
A.1 Extracción química de compuestos bioactivos	52
A.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos.	53
B) Búsqueda de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica	57
B.1.- Cuantificación de proteínas.	58
B.2.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)	59
7.7.4 Caracterización de los antimicrobianos utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).	60
8. DISCUSIÓN	63
9. CONCLUSIONES	86
10. RECOMENDACIONES	87
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
12. ANEXOS	104

RESUMEN

La resistencia por parte de bacterias patógenas hacia los antibióticos β -lactámicos es un problema de salud pública que está en aumento. Esto crea la necesidad de investigar nuevos y mejores compuestos antimicrobianos. Los actinomicetos son un grupo de microorganismos ampliamente distribuidos en la naturaleza y son la fuente más común de producción de nuevos antibióticos.

Para el presente estudio, un actinomiceto de origen marino (cepa 13A-2) fue seleccionado por su antagonismo frente a una colección estándar de bacterias patógenas de humanos. Se caracterizó fenotípicamente incluyendo la actividad multienzimática sobre diferentes sustratos. Las pruebas de antagonismo *in vitro* de la cepa 13A-2 se realizó contra 16 bacterias Gram negativas β -lactámico-resistentes procedentes de un centro hospitalario de Lima, y pertenecientes a *Klebsiella*, *Proteus* y *Escherichia coli*. El proceso fermentativo se realizó en el medio Marino y un medio propuesto en el presente trabajo. Para la caracterización preliminar de los metabolitos antimicrobianos se preparó extractos orgánicos utilizando solventes de diferentes polaridades. El análisis bioquímico para determinar la naturaleza de los metabolitos de la cepa 13A2 se realizó utilizando técnicas de Qubit Fluorometer, Bradford, PAGE-SDS y HPLC. Los resultados indican que el actinomiceto 13A-2 tiene capacidad de inhibir a la totalidad de las bacterias β -lactámico-resistentes utilizadas en este estudio, siendo *Proteus sp.* y *Klebsiella sp.* las menos sensibles. La caracterización preliminar de los metabolitos indica la presencia de al menos 5 bandas bioactivas de naturaleza peptídica. La cepa 13A-2 del actinomiceto marino fue identificada molecularmente como *Streptomyces sp.* Se concluye que los

actinomicetos marinos producen compuestos que son efectivos contra bacterias β -lactámico-resistentes.

Palabras claves: Actinomicetos marinos, péptidos antimicrobianos, actividad antagonista, patógenos β -lactámico resistentes,

ABSTRACT

The pathogenic bacteria β -lactamic resistant are an increasing public problem. This creates the need to investigate new and better antibiotics. Actinomycetes are a widely distributed group of microorganisms in nature and are the most common source of new antibiotics production. In this study, a marine actinomycete (strain 13A-2) was selected for his antagonist activity against a standard set of human pathogenic bacteria. This strain was characterized phenotypically including the activity of many enzymes on several substrates. The evidence of strain 13A-2 antagonist activity in vitro was carried out against 16 Gram-negative bacteria β -lactam-resistant isolated from one Lima's Hospital which belongs to *Klebsiella*, *Proteus* and *Escherichia coli*.

The fermentation process was achieved on Marino and ECOLINO 322 mediums. This last is new and proposed in this study. Preliminary characterization of metabolites antimicrobial organics was done using solvents of different polarities. Biochemical analysis to determine the nature of the metabolites from strain 13A2 was performed using Qubit Fluorometer, Bradford, SDS-PAGE and HPLC techniques. The results indicate that the actinomycete 13A-2 inhibited all of the β -lactam resistant pathogenic bacteria tested, where *Proteus sp.* and *Klebsiella sp.* are the least sensitive. The characterization of metabolites indicates the presence of 5 bands, so this antimicrobial substance might be peptide nature.

The marine actinomycete strain 13A-2 was identified as *Streptomyces sp.* By rRNA 16S. We conclude that the marine actinomycete 13A-2 produces effective compounds against β -lactamic-resistant pathogenic bacteria.

Key words: marine actinomycetes, antimicrobial peptides, antagonist activity, β -lactamic resistant pathogen.

13.INTRODUCCIÓN

La Naturaleza ha proporcionado por miles de años innumerables agentes medicinales para el hombre. Es impresionante el número de drogas que se han aislado desde fuentes naturales, especialmente plantas, las que han formado la base de un sistema de medicina durante milenios (Cragg & Newman, 2001). El siglo pasado fue testigo de una creciente producción de metabolitos y/o drogas de origen microbiano. Desde el descubrimiento casual de la penicilina por Fleming en 1929 a partir de un cultivo de *Penicillium notatum* fue el inicio de la “Edad dorada de los Antibióticos”, ha habido una intensa investigación destinada a descubrir nuevos productos de interés biomédico a partir de microorganismos ambientales (Tortora *et al.*, 2001). Estos descubrimientos han incluido antibióticos como penicilinas (desde especies de *Penicillium sp.*), cefalosporinas (desde *Cephalosporium sp.* y *Acremonium sp.*), aminoglicósidos, tetraciclinas, agentes inmunosupresores como la ciclosporina (a partir de *Trichoderma* y *Tolypocladium*), agentes que disminuyen el colesterol, como la mevastatina (desde especies de *Penicillium*) y lovastatina (de *Aspergillus*), drogas antihelmínticas y antiparasitarias como las ivermectinas (desde *Streptomyces*), antitumorales como las familias de compuestos del ácido aureólico, mitomicina y actinomicina, e incluso agentes antidiabéticos (Cragg & Newman, 2001).

El incremento de resistencia por parte de bacterias patógenas hacia los antibióticos de uso clínico ha desarrollado una seria amenaza en la salud pública. Esto es crítico y crea la imperiosa necesidad para identificar nuevos

antimicrobianos o para diseñar inhibidores de enzimas que confieren resistencia a antibióticos (Wanshi *et al.*, 2003). Los antibióticos β -lactámicos tales como las penicilinas y cefalosporinas están entre los agentes antimicrobianos usados con mayor frecuencia. La resistencia a estos y otros antibióticos, ha ido incrementándose en los años recientes. El mecanismo más común de resistencia a antibióticos β -lactámicos es la producción de beta lactamasas (Livermore, 1995). Estas son enzimas secretadas tanto por bacterias Gram negativas como Gram positivas y les proveen resistencia porque hidrolizan el anillo beta lactámico que es común a esta clase de antibióticos.

En los últimos 60 años se han descubierto entre 30.000 y 50.000 productos naturales de origen microbiano, de los cuales más de 10.000 son biológicamente activos y más de 8.000 son antibióticos y agentes antitumorales. Debido a que la mayoría de estos compuestos tienen un origen terrestre, el ritmo de descubrimiento de moléculas nuevas ha disminuido drásticamente, estimándose que más del 90% de los cultivos de microorganismos terrestres producen sustancias ya conocidas o con pequeñas variaciones de una molécula ya existente (Fenical, 1993). Hoy en día, se considera que los futuros programas de “screening” de nuevas drogas, deben considerar la búsqueda de nuevas especies o géneros de microorganismos, así como su búsqueda en ambientes no explorados anteriormente (Nolan & Cross, 1988). Esta disminución en la tasa de hallazgo de nuevos metabolitos ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos en el ambiente acuático, que ofrece la posibilidad de encontrar cepas silvestres aún no descritas y que

podrían producir nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente relevantes (Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Leiva *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2001). Por ello en los últimos 20 años más o menos unos 10 000 metabolitos o compuestos bioactivos han sido extraído de varios organismos marinos como los tunicados, esponjas, corales blandos, nudibranquios, briozoarios, algas, hongos y bacterias, muchos de los cuales han exhibido nuevas y novedosas estructuras moleculares con interesantes propiedades farmacológicas (Munro *et al.*, 1999)

Actualmente, se considera que los nuevos metabolitos bioactivos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos es una rica fuente para el descubrimiento de nuevas drogas. Los compuestos obtenidos a partir de microorganismos acuáticos presentan propiedades antimicrobianas, antitumorales, antiinflamatorias, etc. muchos de los cuales pertenecen a clases químicas no descritas en microorganismos terrestres. Los océanos poseen la mayor riqueza filogenética sobre la tierra, presentando el mayor número de animales, plantas y microorganismos. Ellos han desarrollado una serie de estrategias metabólicas y fisiológicas, que les permitan sobrevivir en este medio extremo, lo cual puede significar la producción de metabolitos estructuralmente distintos a los encontrados en sus contrapartes terrestres (Jensen & Fenical, 1994).

La investigación de cepas productoras de sustancias bioactivas en el ambiente marino ha abarcado hábitats tan diversos como: columna de agua, sedimentos y tejidos de invertebrados. Las expectativas futuras de la utilización de

actinomicetos con fines industriales ha conducido a los investigadores a la búsqueda de nuevas cepas de origen acuático (Leiva *et al.*, 2000). Entre los actinomicetos, las cepas del género *Streptomyces* son unas de las de mayor importancia biomédica y farmacológica (Zheng ZH *et al.*, 2000).

14.MARCO TEÓRICO

2.1 Phylum Actinobacteria. Generalidades

El Phylum Actinobacteria comprende una extensa variedad de microorganismos de amplia distribución. La principal característica de este grupo de bacterias Gram positivas corresponde a los altos niveles de G + C de su ADN; así como el desarrollo de una estructura micelial, cualidad compartida únicamente por los grupos más representativos como los géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, entre otros. La distribución de los actinomicetales en la naturaleza es ubicua. Los suelos y sedimentos son ambientes propicios para la colonización por medio del desarrollo de hifas vegetativas, asociadas a un micelio aéreo donde la diferenciación celular conlleva a la producción de esporas. Estas estructuras son resistentes tanto a la temperatura como a otras condiciones adversas, característica que les permite persistir en ambientes que muestran condiciones de stress abiótico (Hopwood, 2000).

La gran mayoría de este grupo de microorganismos se comporta como saprófitos naturales en su ambiente, cumpliendo un rol importante en el ciclo del carbono y transformación de la materia orgánica. La gran complejidad química de los metabolitos producidos por los actinomicetos les permite participar en diferentes relaciones ecológicas, desde relaciones químicas dentro de una población microbiana (Bibb, 2005) hasta relaciones interespecíficas que relacionan la cooperación de ciertos actinomicetos con algunos organismos superiores (Dharmaraj & Sumantha, 2009). Un ejemplo lo

constituye la gama de enzimas extracelulares producidas por actinomicetos. Se han realizado una vasta cantidad de estudios en biotecnología basados en la obtención y purificación de enzimas de interés industrial mediante la fermentación de cepas de este grupo microbiano (Erpicum *et al.*, 1990; El Shahed *et al.*, 2008; Narayana & Vijayalashmi, 2009)

La producción de antibióticos por actinomicetos está ligada con el fenómeno ecológico de antagonismo bacteriano, en el que la producción de sustancias inhibitorias por un microorganismo a condiciones específicas puede reducir o limitar el crecimiento de otra población, generando variaciones en la estructura de comunidades microbianas. Los estudios de producción de antibióticos en actinomicetos datan de los años cuarenta, cuando Waksman y sus colaboradores publicaron el descubrimiento de la actinomicina (Waksman & Woodruff, 1941), la estreptomycinina (1994) y posteriormente la neomicina (Waksman & Lechevalier, 1949) a partir de especies del género *Streptomyces*. Actualmente el descubrimiento de nuevos antibióticos más efectivos y con efectos secundarios menores son evaluados por los grandes laboratorios farmacéuticos tales como Bayer, Merck, Astra Zeneca, Abbott, Pfizer, etc para producirlos y comercializarlos a nivel mundial.

2.2 El género *Streptomyces*

2.2.1 Generalidades

Los Streptomicetos son los microorganismos más estudiados dentro del orden de los Actinomycetales, siendo el género *Streptomyces* el mejor conocido (Locci, 1989). Este género agrupa bacterias miceliares Gram positivas y fundamentalmente aerobias, aunque en determinadas condiciones se ha descrito que pueden crecer en anaerobiosis (Van Keulen *et al.*, 2003). Son microorganismos que poseen un cromosoma lineal de gran tamaño, superando en todos los casos las 8 Mb. Otra característica destacable del género es su complejo ciclo de vida, el cual conlleva diferenciación morfológica. El género *Streptomyces*, con más de 500 especies descritas, constituye uno de los grupos de bacterias más numerosas y presenta una gran diversidad (<http://www.bergeys.org/outlines.html>). Su hábitat natural más común es el suelo, aunque también se han hallado en medios acuáticos (Moran *et al.*, 1995). Viven de forma saprofítica degradando restos orgánicos, principalmente vegetales (Hodgson, 2000). Esta capacidad descomponedora es posible gracias a la producción de una amplia gama de enzimas extracelulares hidrolíticas, algunas de ellas con aplicaciones en la industria. La liberación de nutrientes al medio a partir de biopolímeros insolubles como la lignina, pectina, quitina, celulosa, etc, convierte a las distintas especies de *Streptomyces* en microorganismos centrales en el reciclaje de carbono. Además de su versatilidad metabólica, este género posee una atractiva y variada capacidad biosintética. Son microorganismos capaces de sintetizar una gran colección de

metabolitos secundarios con actividades biológicas variadas tales como: antitumorales, inmunosupresoras, antibióticas, herbicidas, inhibidores enzimáticos, pigmentos, aromas, etc. (Thompson *et al.*, 2002; Hopwood, 2003). Muchos resultan tener aplicaciones realmente valiosas en medicina, veterinaria y agricultura.

2.2.2 Organización genómica

Los cromosomas de estas bacterias son anormalmente grandes. El tamaño varía entre 8 y 9 Mb en función de la especie, lo que llega a duplicar a otros cromosomas bacterianos como el de *Escherichia coli* (Smith *et al.*, 1987) o el de *Bacillus subtilis* (Young, 1974), que apenas sobrepasan las 4 Mb. Además, otra característica relevante de su composición genómica es el elevado contenido en guanina y citosina (G+C), presentando un porcentaje entre el 70 y el 74 %. El cromosoma lineal de las distintas especies de *Streptomyces sp.* contiene en sus extremos secuencias cortas repetidas e invertidas que se consideran los telómeros del mismo y cuyo tamaño varía según la especie, desde las 24 kb en *S. griseus* a las 210 kb de *S. ambofaciens* (Goshi *et al.*, 2002). A estas secuencias se unen proteínas mediante enlaces covalentes en los extremos 5' y su papel es esencial en la replicación del DNA (Bao & Cohen, 2001).

Dentro de este género, se considera a *Streptomyces coelicolor* la especie más representativa. A lo largo de los años se han desarrollado gran cantidad de

herramientas genéticas para su manipulación, por lo que es la especie mejor conocida genéticamente.

2.2.3 Ciclo de vida

El ciclo de desarrollo de los microorganismos del género *Streptomyces* es un proceso complejo a lo largo del cual se han descrito estructuras diferenciadas. Este proceso de diferenciación ha sido ampliamente estudiado en medio sólido, debido principalmente a que en cultivos líquidos la mayoría de las cepas no son capaces de esporular. Las estructuras diferenciadas en cultivos de superficie son: un micelio sustrato, producto de la fase vegetativa del ciclo y un micelio aéreo o reproductivo, que culminará su desarrollo con la formación de esporas (Figura 1).

Una de las peculiaridades de este género es que sólo se encuentran como microorganismos unicelulares en una de las fases del desarrollo, la fase de espora (Chater & Losick, 1997). Cuando las condiciones del medio son favorables se produce la germinación de la espora y se origina el micelio sustrato. Esta estructura está formada por un entramado de hifas ramificadas donde los septos son escasos y delimitan compartimentos que contienen varias copias del genoma (Waksman, 1967; Chater y Losick, 1997). Tras este crecimiento vegetativo, en el cual los nutrientes disponibles del medio se han transformado eficientemente en biomasa micelial, comienzan a originarse hifas menos ramificadas que crecen elevándose sobre la colonia formando el micelio aéreo. El desarrollo de este micelio se lleva a cabo, al menos en parte, a

expensas de los nutrientes provenientes de la lisis del micelio sustrato (Méndez *et al.*, 1985).

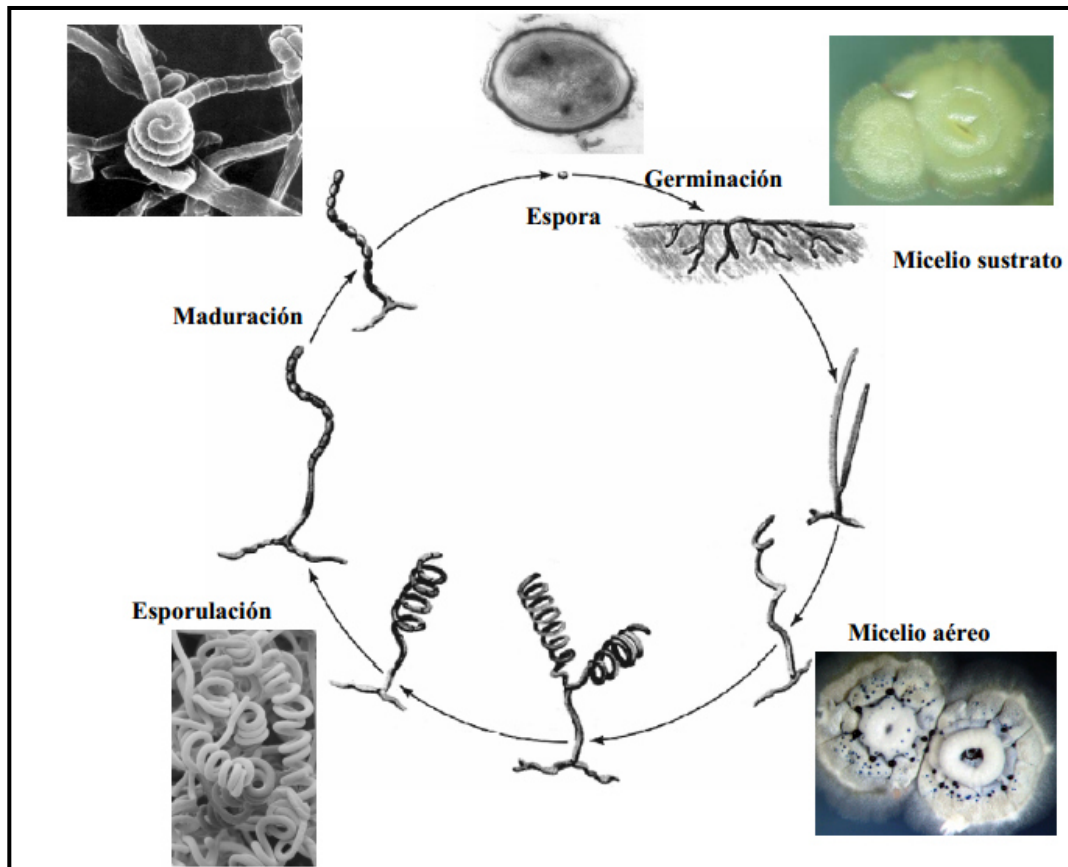


Figura 1. Ciclo de vida de *Streptomyces* (Modificado de Chater, 1979).

En los últimos años se ha descrito que el desarrollo del micelio es un proceso más complejo y heterogéneo de lo que se creía en un principio. Cuando germina la espora se forma un micelio joven compartimentalizado, denominado micelio primario, en el cual, tras una temprana ronda de muerte celular alternan segmentos vivos y muertos en la misma hifa (Manteca *et al.*, 2005; Manteca *et*

al., 2005). Posteriormente, a partir de los segmentos vivos anteriores se generan islas de micelio no compartimentalizado (sincitio), denominado micelio secundario, que es el precursor del micelio aéreo (Manteca *et al.*, 2007). Estos autores proponen como fase vegetativa de crecimiento la que implica el desarrollo del micelio primario compartimentalizado, considerando la fase reproductiva, el resto de eventos del desarrollo. La fase reproductiva del ciclo culmina cuando las hifas aéreas detienen su crecimiento y comienzan a fragmentarse transversalmente, transformándose en largas hileras de esporas unigenómicas e hidrofóbicas (Chater & Losick, 1997). En el caso del desarrollo de colonias aisladas así como del desarrollo de ***Streptomyces*** en suelos y en cultivos sumergidos, la fase vegetativa del ciclo se alarga en el tiempo siendo la predominante (figura 2) oponiéndose a lo que ocurre en medios de cultivo complejos y condiciones estándar de laboratorio (ej. densos inóculos de esporas y temperatura de crecimiento de 28-30° C) (Manteca & Sánchez, 2009). Tanto la formación como la metamorfosis de las hifas aéreas reproductivas, que recuerda al comportamiento de los hongos filamentosos, permite la dispersión y colonización de nuevos nichos.

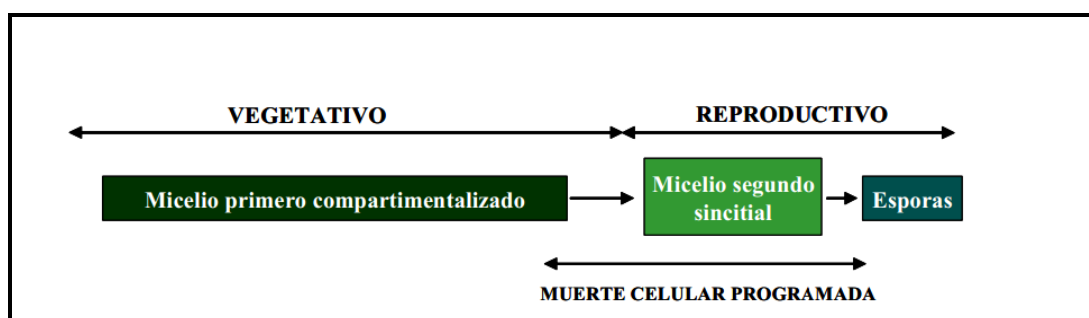


Figura 2. Fases características del ciclo celular de ***Streptomyces sp.*** crecido en condiciones naturales según se propone Manteca & Sánchez (2009).

La síntesis de metabolitos secundarios coincide generalmente con el comienzo de la diferenciación morfológica y la formación del micelio aéreo. Estos dos procesos muestran elementos comunes de regulación génica (Hopwood, 1988), pero, en general, hay poca información acerca de las señales que activan los mecanismos reguladores pleiotrópicos y de la red reguladora común a ambos procesos.

2.2.4 Moléculas señal, regulación y control genético

A medida que crece el micelio sustrato comienza a haber limitación de nutrientes y otros tipos de estrés fisiológico. La adaptación a estos cambios es mediada en parte vía nucleótidos polifosforilados como es el ppGpp, sintetizado por el gen *relA* (Chakraborty *et al.*, 1996). Se ha comprobado que la síntesis de ppGpp produce variaciones importantes en la fisiología de las células provocando un cambio en el perfil transcripcional: baja la expresión de genes de desarrollo vegetativo y aumenta la de los responsables de diferenciación y metabolismo secundario (Hesketh *et al.*, 2007). Otras moléculas de señalización química que intervienen en el proceso de diferenciación son las γ -butirolactonas. Estas moléculas, junto con sus receptores específicos, pueden ser consideradas como hormonas bacterianas. Sus genes biosintéticos, así como sus receptores, son importantes en los procesos de diferenciación morfológica y bioquímica. El factor A producido por *S. griseus* es la γ -butirolactona mejor conocida hasta la fecha. Su efecto pleiotrópico sobre diferenciación y producción de antibióticos ha sido ampliamente caracterizado por varios autores (Chater & Horinouchi, 2003; Ohnishi *et al.*, 2005). En muchos otros estreptomicetos se han encontrado múltiples homólogos a los

receptores de γ - butirolactonas y la mayoría están localizados próximos a clusters biosintéticos de antibióticos (Takano, 2006).

A parte de las moléculas de señalización citadas (ppGpp y butirolactonas) hay dos grupos de genes cuyos productos están implicados en los procesos de desarrollo morfológico (Chater & Horinouchi, 2003). Estos genes son *bldy whi*; y ambos codifican en su mayoría proteínas reguladoras.

2.2.5 Metabolismo secundario en *Streptomyces*

Durante el ciclo biológico de *Streptomyces* se pueden diferenciar dos tipos de metabolismo, primario y secundario. El metabolismo primario se define como el conjunto de reacciones anabólicas y catabólicas cuyo resultado es el mantenimiento de los procesos vitales de la célula (síntesis de ácidos grasos, proteínas, lípidos, polisacáridos, coenzimas etc.) y el incremento de la biomasa total. Estos procesos son esencialmente idénticos en todas las células vivas. Por el contrario, en el metabolismo secundario se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo productor.

No obstante, los productos originados suelen conferir ventajas ecológicas y consecuentemente una mayor competitividad biológica.

Los metabolitos secundarios poseen algunas características comunes entre las que se pueden resaltar las siguientes:

- La mayoría de los compuestos son específicos de la cepa productora.
- Presentan estructuras químicas y actividades biológicas muy variadas.
- En general son productos de complejas rutas biosintéticas.

La síntesis de los metabolitos secundarios se produce al final de la fase de crecimiento exponencial o en la fase estacionaria, y se encuentra estrechamente relacionada con la diferenciación morfológica en *Streptomyces* tal como se ha comentado previamente (Figura 1).

2.2.6 Producción de metabolitos secundarios en *Streptomyces*.

Dentro del amplio y heterogéneo abanico de metabolitos secundarios producidos por *Streptomyces* son muchos los que tienen aplicaciones industriales (Tabla 1). Dentro de este grupo destacan los antibióticos por sus extensas aplicaciones clínicas. Las bacterias de este género producen más del 50 % de los antibióticos naturales disponibles actualmente. Los antibióticos se definen como metabolitos de bajo peso molecular producidos principalmente por microorganismos, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o causar la muerte de otros microorganismos a bajas concentraciones. Los genes cuyos productos intervienen en su biosíntesis están físicamente agrupados en clusters. Bibb & Hesketh, 2009.

Tabla 1. Nuevos metabolitos aislados de actinomicetos durante el periodo 2003 - 2005 (LAM, 2006)

Composto	Microrganismo	Atividade
Abissomicina	Verrucosipora sp.	Antibacteriana
Aureoverticilactama	<i>Streptomyces aureoverticillatus</i>	Anticâncer
Bonactina	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriana e antifúngica
Caprolactonas	<i>Streptomyces sp.</i>	Anticâncer
Chandrananimicinas	<i>Actinomadura sp.</i>	Antibacteriana, anticâncer, antifúngica
Chinikomicinas	<i>Streptomyces sp.</i>	Anticâncer
Cloro-dihidroquinonas	Novo actinomiceto	Antibacteriana, anticâncer
Diazepinomicina (ECO-4601)	<i>Micromonospora sp.</i>	Antibacteriana, anticâncer, antiinflamatória
Indóis 3,6-disubstituídos	<i>Streptomyces sp.</i>	Anticâncer
Frigociclinona	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacteriana
Glaciapirróis	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriana
Gutingimicina	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriana
Helquinolina	<i>Janibacter limosus</i>	Antibacteriana
Himalomicinas	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriana
IB-00208	<i>Actinomadura sp.</i>	Anticâncer
Komodoquinona A	<i>Streptomyces sp.</i>	Atividade Neurotogénica
Lajolamicina	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacteriana
Marinomicinas	' <i>Marinispora</i> '	Antibacteriana, anticâncer
Mechercharmicinas	<i>Thermoactinomyces sp.</i>	Anticâncer
MKN-349A	<i>Nocardiopsis sp.</i>	Desconhecida
Salinosporamida A (NPI-0052)	<i>Salinispora tropica</i>	Anticâncer
Esporolidas	<i>Salinispora tropica</i>	Desconhecida
Trioxacarcinas	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibacteriana, anticâncer, antimalária

2.3.- Actinomicetos de ambientes marinos

Hoy en día, se considera que los futuros programas de “screening” de nuevas drogas, debe considerar la búsqueda de nuevas especies o géneros de microorganismos en ambientes no explorados anteriormente (Nolan & Cross, 1988). Esto ha llevado a la búsqueda de nuevos compuestos en el ambiente acuático, que ofrece la posibilidad de encontrar cepas silvestres aún no descritas y que podrían producir nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente relevantes (Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Leiva *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2001).

Los organismos marinos representan un arsenal de nuevas y novedosas sustancias, de una increíble diversidad. Esta variedad de estructuras químicas pueden ser utilizadas como herramientas para la síntesis de nuevas moléculas, con el fin de desarrollar productos útiles en la industria farmacéutica y agrícola. En el ambiente marino los antibióticos y otros metabolitos secundarios cumplirían funciones de supervivencia, confiriéndoles a los microorganismos productores una ventaja selectiva respecto a otras poblaciones microbianas que compiten por el mismo nicho (Vining, 1990).

Las expectativas futuras de la utilización de actinomicetos con fines industriales ha conducido a los investigadores a la búsqueda de cepas a partir de agua y sedimentos acuáticos (Leiva *et al.*, 2000). Entre los actinomicetos, las cepas del género *Streptomyces* son unas de las de mayor importancia para la obtención de sustancias de interés biológico como antibióticos, antifúngicos y antitumorales. No obstante, nuevos metabolitos se han reportado no solamente de actinomicetos, sino también de otros grupos bacterianos tales como las heterotróficas *Alteromonas*, *Chromobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, cianobacterias, hongos y microalgas (Girones *et al.*, 1989; Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Uribe *et al.*, 1994; Heyduck-Söller & Fisher, 2000).

En los últimos años para enfrentar a los grandes problemas de salud pública y enfermedades hasta hoy considerados incurables como el SIDA o el cáncer se han explorado diversos ecosistemas marinos que representan uno de los hábitats favoritos en la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos (Bonar *et al.*, 1986). Además, el surgimiento de nuevas enfermedades en el mundo

moderno (enfermedades emergentes y reemergentes) y la aparición cada vez mayor de patógenos antibiótico-resistentes, han generado la necesidad de evaluar diversos compuestos naturales con actividad antimicrobiana como una alternativa en el tratamiento de enfermedades infecto-contagiosas y de esta manera contrarrestar algunos de estos problemas de salud pública (Jensen *et al.*, 2005)

A nivel mundial ya existen varios compuestos antibióticos obtenidos a partir de esponjas marinas, estos antimicrobianos ya se encuentran disponibles comercialmente y otros están siendo sometidos a estudios preclínicos y clínicos, algunos ejemplos son: Spongistatina (de *Hyrtilos erecta*) y Aurantosidos (de *Siliquariaspongia japonica* y *Homophymia confiera*), entre los agentes antifúngicos disponibles comercialmente. *Sammaplina A* (de *Psammaplysina* sp.) se utiliza para el control de *S. aureus* resistente a la metilicina, cuya actividad es comparable con la ciprofloxacina. La Oceanapisida (de *Oceanapia*) posee actividad antifúngica contra *Candida glabrata*. Los sulfatos de Acantosterol (de *Acanthodendrilla* sp.) son activos contra cepas de *S. cerevisiae*. Las Cribrostatinas (de *Cribrochalina* sp.), entre las cuales la Cribrostatina es la más activa frente a hongos y bacterias, incluyen *Neisseria gonorrhoeae* y *Streptococcus pneumoniae* (Mora *et al.*, 2008).

15.HIPÓTESIS

- “La cepa nativa de actinomiceto 13A-2 de origen marino produce compuestos antimicrobianos capaces de inhibir el desarrollo de bacterias β -lactámico-resistentes de origen hospitalario”.

16.OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del actinomiceto marino cepa 13A-2 frente a bacterias β -lactámico-resistentes y caracterizar preliminarmente los compuestos antimicrobianos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el comportamiento cultural y caracterizar fenotípicamente el actinomiceto 13A-2, aislada de una esponja marina.
2. Determinar la capacidad multienzimática de la cepa 13A-2 por su actividad hidrolítica sobre diversos sustratos.
3. Evaluar la capacidad antimicrobiana del actinomiceto cepa 13A-2 mediante pruebas de antagonismo *in vitro* frente a bacterias patógenas productoras de β -lactamasas de origen clínico.
4. Evaluar la actividad inhibitoria de la cepa 13A-2 en función de diferentes fuentes nutricionales.
5. Caracterizar preliminarmente los compuestos antimicrobianos, mediante la extracción con solventes orgánicos, cuantificación por Qubit fluorometer y separación por técnicas electroforéticas (PAGE-SDS) y cromatográficas (HPLC).
6. Identificar molecularmente la cepa de actinomiceto 13A-2.

17.MATERIALES

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepa de actinomiceto de origen marino aislado de una esponja calcárea colectada en el litoral de Máncora – Tumbes, Perú. La cepa fue registrada con el código 13A-2 y pertenece a la colección de cepas del Laboratorio de Ecología Microbiana, Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú.
- Bacterias patógenas declaradas como β -lactámico-resistentes (Tabla 2), las cuales fueron aisladas de pacientes hospitalizados por infecciones de las vías urinarias en un Centro Hospitalario de Lima, Perú.
- Cepas de referencia de American Type Culture Collection (ATCC): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

18.MÉTODOLOGÍA

6.1 Comportamiento cultural y caracterización fenotípica de la cepa 13A-2.

Se evaluó el crecimiento del microorganismo elegido sobre diferentes medios de cultivo tales como Agar Marino, Agar Czapeck, Agar Winosgrasky, Agar Ashby y Agar Extracto de Levadura y Manitol (YEM, por sus siglas en inglés). Asimismo, se utilizó por vez primera un medio de cultivo propuesto por el autor, al cual se denominó medio ECOLINO 322 (anexo). El proceso de sembrado en los diferentes medios se realizó siguiendo las pautas señaladas según León *et al.* (1998).

Además se evaluó la actividad degradativa sobre diferentes carbohidratos tales como: glucosa, sacarosa, galactosa, maltosa; así como diferentes aminoácidos tales como arginina, lisina, fenilalanina y triptófano. La coloración Gram se usó para la observación de esporas y estructuras miceliales. Además, se evaluó el crecimiento de la cepa en estudio cada 24 horas sobre medio líquido para determinar por cuantos días se mantiene viable dicho actinomiceto. Esta evaluación permitió elegir con mayor precisión los días que duró el proceso fermentativo de la cepa en estudio (Figura 3).

6.2 Pruebas de actividad multienzimática

Se realizaron las pruebas de actividad multienzimática en diferentes sustratos: almidón (10 g/L), Tween 80 (10 mL/L), caseína (100 mL/L), lecitina (10 g/L), celulosa (10 g/L) , gelatina (5 g/L) colocados sobre el medio base de Agar Marino, en el caso de DNA se evaluó con un medio ya formulado denominado BBL DNase Test Agar w/Toluidine Blue. Posteriormente se sembró la cepa de

actinomiceto a evaluar y se incubó a 30°C por 7 días (León *et al*, 1998). Las pruebas se realizaron por triplicado.

6.3 Pruebas de antagonismo primario frente a bacterias estándar ATCC y selección del mejor actinomiceto antagonista.

Este primer ensayo de antagonismo se realizó frente a *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se realizó mediante el método de “doble capa” de Westerdahl *et al* (1991) modificado por León y García-Tello (1998). Los actinomicetos fueron sembrados como macrocolonias en Agar Marino incubadas a 28 °C y dejadas crecer por 7 días. Para las pruebas de antagonismo las cepas testigo, *E. coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, fueron previamente reactivadas en Caldo Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) por 18-24 horas. Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante la inoculación de 50 µl de cepas testigo (escala 0,5 de MacFarland) en 5mL de caldo Tripticasa Soya semisólido (0,75 % agar agar) la cual después de una breve homogenización se agregó a modo de “segunda capa” sobre los cultivos del actinomiceto, se dejó solidificar 10 minutos y se incubó a 30°C por 24 h. Al cabo de este tiempo se realizó las lecturas correspondientes mediante la medida de los halos de inhibición (diámetro en mm).

Este ensayo permitió seleccionar a la cepa de actinomiceto como el microorganismo con mejor actividad antimicrobiana y seleccionarla para las

demás evaluaciones incluyendo el enfrentamiento contra las bacterias patógenas β -lactámico resistentes.

6.4 Pruebas de antagonismo del actinomiceto 13A-2 frente a *E.coli* ATCC 25922 y *E.coli* ATCC 8739 usando diferentes medios de cultivo.

Mediante este ensayo se buscó evaluar cómo influyen los nutrientes sobre la actividad antimicrobiana del actinomiceto seleccionado. Para este estudio los cultivos se realizaron en los siguientes medios: Agar Tripticasa Soya, Agar Marino, Medio ECOLINO 322 y Medio ECOLINO 322 mas extracto de levadura (EL) (Ver anexo).

Las evaluaciones se realizaron siguiendo el procedimiento señalado en el punto 6.3.

Los halos de actividad antimicrobiana fueron medidos al cabo de 18 horas de realizado el ensayo.

6.5 Pruebas de antagonismo del actinomiceto 13A-2 frente a bacterias β -lactámico-resistentes de origen hospitalario.

La capacidad antagonista del actinomiceto seleccionado se realizó mediante la técnica de bicapa, (Westerdahl *et al.* 1991) modificado por León y García-Tello (1998), según la secuencia señalada en el punto 6.3, pero esta vez se enfrentó contra 16 bacterias β -lactámico resistentes de origen clínico provenientes de un Hospital de Lima (Tabla 2).

Tabla 2. Cepas patógenas β -lactámico-resistentes utilizadas en el presente estudio, procedentes de un centro hospitalario de Lima.

CÓDIGO	ESPECIE
242	<i>E.coli</i> BLEE
249	<i>E.coli</i> .BLEE
251	<i>E.coli</i> BLEE
306	<i>E.coli</i> BLEE
331	<i>E.coli</i> BLEE
337	<i>Klebsiella sp.</i> BLEE
335T	<i>E.coli</i> BLEE
512	<i>E.coli</i> BLEE
P.SISTITO	<i>E.coli</i> BLEE
9542	<i>E.coli</i> BLEE
9629	<i>E.coli</i> BLEE
9654	<i>E.coli</i> BLEE
9065	<i>E.coli</i> BLEE
709	<i>E.coli</i> BLEE
797	<i>E.coli</i> BLEE
P.ampC	<i>Proteus sp.</i> AmpC

6.6 Identificación genotípica de la cepa 13A-2

La identificación molecular se realizó según lo descrito por Delong (1992) y Altschul (1990). Se dejó en incubación la cepa seleccionada en Caldo Tripticasa Soya (TSA, Britania, Argentina) a 30 °C durante 5 minutos y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación Wizard Genomics (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus iniciales en inglés) se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labet International INC., Woodbridge, NJ, EE.UU), usando cebadores universales para procariotas 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG'3 y 5'-GGT TAC CTT ACG ACTT-3'. Los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de MacroGen INC (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la Base de Datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Alignment Search Tool) según Altschuk *et al.*, 1990.

6.7 Caracterización preliminar de compuestos antibacterianos

6.7.1 Proceso Fermentativo.

La obtención de los extractos antibacterianos se realizó de acuerdo a la metodología empleada por Srinivisan *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. En matraces de 100 mL se colocó 25 mL de Caldo Marino (anexo), inoculando la cepa en estudio y dejando a 250 rpm durante 48 h (caldo iniciador o “estárter”). El proceso fermentativo se realizó en matraces de 500 mL conteniendo respectivamente Caldo Marino simple, Caldo Marino compuesto y el caldo ECOLINO 322 (formulado por el autor). A cada medio se le adicionó 125 mL del caldo “starter”.

Este proceso fue evaluado durante 12 días a 250 rpm de agitación y temperatura ambiente (20 - 22°C como promedio). Los tres cultivos fueron evaluados por el rendimiento antimicrobiano de sus sobrenadantes. El pH de los caldos evaluados fue medido diariamente.

6.7.2 Evaluación de actividad antibacteriana en los sobrenadantes.

Para saber si los sobrenadantes recuperados poseen actividad antibacteriana los cultivos fueron centrifugados a 5 000 rpm durante 25 minutos. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante prueba de pocillos, según Mannangatti *et al.*, (2011) y Peela *et al.*, (2005), para lo cual los sobrenadantes fueron tamizados sobre gasa estéril y luego filtrados utilizando membranas y filtros Millipore, ambos de 0,45 µm de porosidad. Estos sobrenadantes libres de células se guardaron en refrigeración (4°C) para los ensayos posteriores.

6.7.3 Extracción y caracterización de compuestos antimicrobianos

Debido al desconocimiento de la naturaleza del compuesto o compuestos responsables del antagonismo se elaboraron 2 protocolos, que se indican a continuación:

- a) Búsqueda de compuestos antibacterianos diferente a péptidos.
- b) Búsqueda de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica.

A) Búsqueda de compuestos antibacterianos no peptídicos.

A.1 Extracción de compuestos bioactivos a partir de sobrenadantes.

Para la extracción de metabolitos con actividad antagonista se procedió según las recomendaciones de Mohan *et al.*, (2008) con algunas modificaciones. Los sobrenadantes luego de ser tamizados usando gasa estéril fueron centrifugados a 5000 rpm por 25 minutos y filtrados utilizando membranas de 0,45 µm de porosidad.

Los solventes evaluados fueron de diferentes polaridades como: diclorometano, acetato de etilo (polaridad intermedia), metanol, n-butanol (polares), éter etílico y hexano (no polares) en una proporción de 1:1 (v/v) (Ver Figura 24). Se extrajeron los compuestos, luego se evaporaron a 40 °C en un rotavapor Buchi a presión reducida hasta obtener material seco (polvo). Los extractos fueron re-suspendidos en Dimetilsulfóxido (DMSO) 5%, luego ensayados por su actividad antimicrobiana mediante técnica en pocillos (Peela *et al.*, 2005).

A.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos.

Para saber si los extractos crudos recuperados en DMSO poseen actividad antibacteriana, previamente se evaluaron mediante prueba en pocillos, señalado en el punto 6.7.2.

B) Búsqueda de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica

B.1 Evaluación cualitativa de proteínas

Se determinó cualitativamente la presencia de proteínas en los sobrenadantes con actividad antimicrobiana mediante la técnica de Bradford la cual se desarrollo siguiendo las recomendaciones según Álvarez (2013), para lo cual se mezclaron 50 μ L de la solución de trabajo (sobrenadantes con actividad antimicrobiana) con 250 μ L del reactivo Bradford, se dejó reposar por 2 minutos y se evidenció cualitativamente la presencia de proteínas por la presencia de una coloración azulina.

B.2.- Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó mediante técnica colorimétrica utilizando el equipo Qubit Fluorometer (INVITROGEN) siguiendo las recomendaciones indicadas por Rojas (2010). Este kit permite detectar la presencia de compuestos de naturaleza peptídica por la propiedad que estas biomoléculas presentan de absorber luz a 280 nm. Este equipo viene con un software incorporado que permite hacer la detección de absorbancia directamente. Esta prueba fue realizada en el laboratorio de Virología del Instituto Nacional de Salud (INS) sede Jesús María.

La muestra fue aquella tomada a los 8 días de fermentación tanto en el Caldo Marino como en el medio ECOLINO 322. Se prepararon dos viales (eppendorf) agregando 190 μ L de buffer y 10 μ L del kit estándar. A otros cuatro eppendorf se tomó 180 μ L de buffer y se completó con 20 μ L de cada muestra, incluyendo los 2 caldos de 8 días de fermentación, uno de suero, como patrón negativo, y un control negativo.

La concentración final se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$C.M = \text{Valor } \alpha. (200/X)$$

Donde:

C.M: concentración muestra

X: μ L de muestra utilizados

Valor α : valor arrojado en el equipo

B.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

La preparación del gel se realizó en condiciones reductoras (4 y 15%) con SDS 0,1 % (según Ligia *et al.*, 2010). Los voltajes fueron primero de 80V por 10 min y luego a 160V por 20 min. El revelado se realizó utilizando 2 tinciones conocidas: en la primera se dejó por 60 minutos con el colorante Azul de Coomassie, luego se decoloró con la mezcla metanol-ácido acético, se dejó 15 minutos nuevamente con el colorante y finalmente se fija con ácido acético. En la segunda tinción se utilizó el colorante Nitrato de Plata, para esto previamente se fija el gel con ácido acético por 30 minutos y luego se agregó el nitrato de plata por 30 minutos. Los marcadores fueron 6, con pesos moleculares de 97, 66, 45, 31, 21 y 14 KD

En cada carril se colocó 15 μ l de muestra, en el carril 1 se colocaron los patrones y a partir del 2do al 10mo carril se colocaron los sobrenadantes cuantificados de 8 días de fermentación. Los sobrenadantes fueron tratados a 100°C por 4 min con excepción de los 2 últimos carriles.

6.7.4 Caracterización de los antimicrobianos utilizando Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC, por sus iniciales en inglés).

Para caracterizar los antimicrobianos mediante HPLC fue necesario comprobar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y extractos.

El sobrenadante del cultivo de la cepa en estudio antes de ser evaluado mediante HPLC fue tamizado, centrifugado y filtrado; además se evaluó su actividad antimicrobiana previamente tanto de los de 3, 5 y 8 días de fermentación. Esta actividad se realizó mediante técnica en pocillos (Peela *et al.*, 2005).

Después se procedió al análisis mediante HPLC Modelo ELITE LaChrom, con bombas de presión Hitachi L-2130, para esta técnica se siguieron las recomendaciones de Moustafa *et al.*, (2001) y Srinivasan *et al.*, (2008) con algunas modificaciones.

Para esta prueba se utilizaron como muestras los sobrenadante del cultivo de la cepa 13A-2 en el medio Ecolino 322 que tenían 3, 5 y 8 días de fermentación y en éste último se había demostrado presencia de antimicrobianos mediante técnica en pocillos y proteínas mediante PAGE-SDS.

Se colocó 1mL de las muestras en cada vial. Las condiciones fueron las siguientes: Columna fase reversa: Rp-18; Temperatura columna: 25°C, con volumen de inyección: 250 µL, proceso isocrático, fase móvil: Metanol HPLC, flujo: 1mL/min, tiempo de corrida: 40 min y longitud de onda de detección: 254nm. Este ensayo se realizó en el laboratorio de Análisis Instrumental de Instituto del Mar del Perú IMARPE con sede en Callao.

7. RESULTADOS

7.1 Comportamiento cultural y caracterización fenotípica del actinomiceto 13A-2.

El actinomiceto 13A-2 en la coloración Gram demostró ser Gram positivo con formación de abundantes hifas a partir del 4to día de crecimiento (Figura 3).

La cepa seleccionada, pudo crecer en todos los medios de cultivo utilizados en este estudio con algunas diferencias marcadas dependiendo del medio. Así, se evidenció un mejor desarrollo en los medios Marino, YEM y Ashby, donde se pudo observar colonias más consistentes y de mayor tamaño; en cambio en el medio ECOLINO 322 el crecimiento fue de menor intensidad (Figura 4). Asimismo, en los medios TSA, Czapeck y Winogradsky el crecimiento fue moderado. Respecto al metabolismo sobre fuentes nitrogenadas, la cepa en estudio fue capaz de asimilar aminoácidos polares como lisina y arginina, sin embargo, en el caso de aminoácidos no polares como fenilalanina y triptófano, esta actividad no fue evidente (Tabla 3).

Respecto al pH de crecimiento se observó que la cepa 13A-2 crece entre 6 a 9, inhibiéndose el crecimiento cuando el pH del medio se encuentra por debajo o por encima de este rango (Tabla 3).

La temperatura a la cual el actinomiceto 13A-2 creció mejor fue entre 30 y 40°C. A temperaturas de 20 y 30°C se observó buen crecimiento aunque algo menor que en el primer caso.

Tabla 3. Capacidad de asimilación de diversos sustratos y crecimiento en función a diferentes parámetros físico-químicos de la cepa 13A-2.

Degradación de azúcares	Glucosa	(+)
	Sacarosa	(+)
	Maltosa	(+)
Degradación de aminoácidos	Lisina	(+)
	Arginina	(+)
	Fenilalanina	(-)
	Triptófano	(-)
Crecimiento a diferentes pH	pH 5	(-)
	pH 6	(+)
	pH 7	(+)
	pH 7.5	(+)
	pH 8	(+)
	pH 8.5	(+)
	pH 9	(+)
	pH 10	(-)
Crecimiento a diferente temperatura	15°C	(-)
	20°C	(+)
	30°C	(+)
	40°C	(+)
	50°C	(-)
Crecimiento en diferentes medios	A. Marino	(+)
	A. Czapeck	(+)
	A. Ashby	(+)
	A. YEM	(+)
	A. Winograsky	(+)
	A.TSA	(+)
	ECOLINO 322 (Nuevo)	(+)

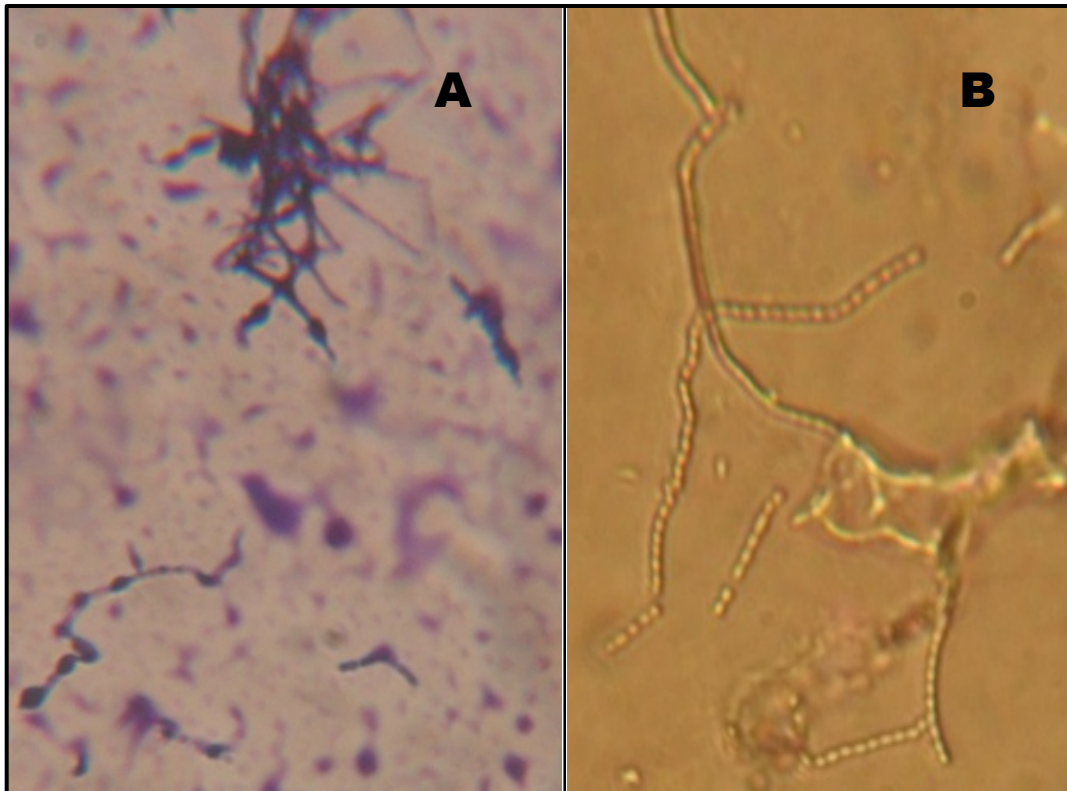


Figura 3. Observaciones al microscopio óptico del actinomiceto 13A-2. 3 días de crecimiento y se observa la formación de las primeras hifas, se observa la elongación de las esporas, coloración Gram (A). Vista directa sin colorear del actinomiceto 13A-2 después de 5 días de crecimiento, se observan hifas bien constituidas (B). La cepa se mantuvo viable hasta los 12 días. Observaciones 100x.

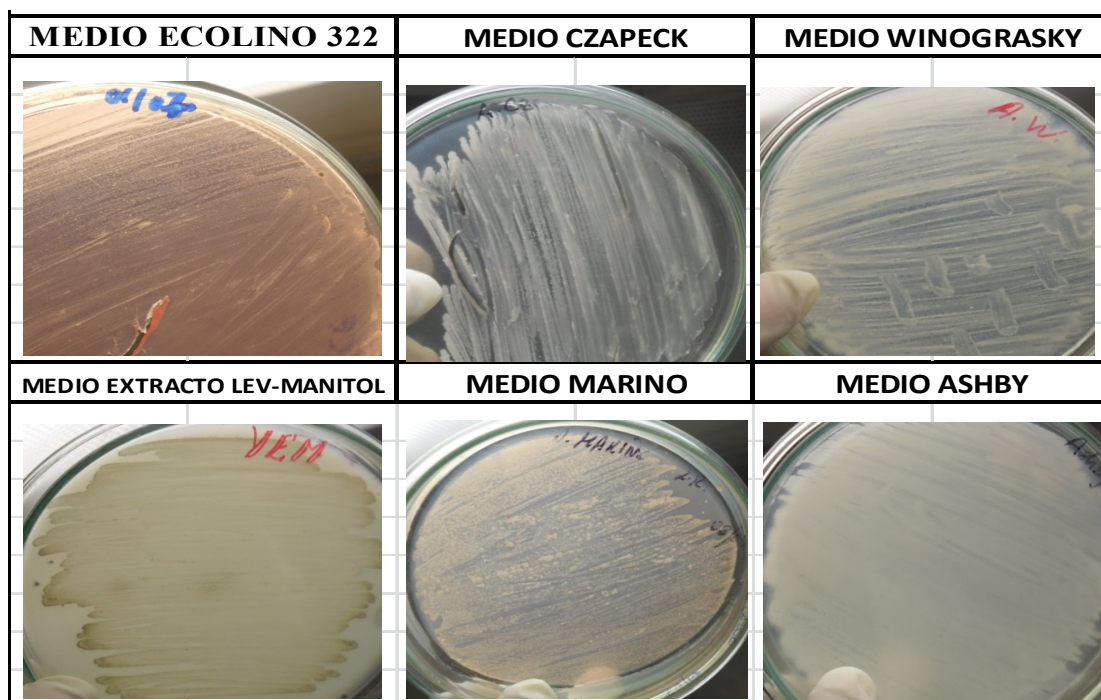


Figura 4. Crecimiento de la cepa 13A-2 en diferentes medios de cultivo.

7.2 Pruebas de actividad multienzimática

Esta caracterización permitió conocer mejor las actividades bioquímicas del actinomiceto en estudio, comprobando que la cepa 13A-2 puede asimilar diferentes sustratos, demostrándose así su alta versatilidad bioquímica (Tabla 4 y Figuras 6-13).

Esta caracterización evidenció que el actinomiceto 13A-2 puede degradar biopolímeros tales como péptidos, polisacáridos y aceites, produciendo amilasas, caseinasas, esterases, colagenasas y lecitinasas.

Para las evaluaciones de la actividad enzimática sobre caseína y DNA se observaron las menores actividades pero para el resto de sustratos la actividad mostró valores mayores a 65%.

A continuación se detallan los resultados del actinomiceto seleccionado cepa 13A2

Tabla 4. Capacidad para degradar diversos sustratos de la cepa 13A-2.

Degradación de diversos sustratos		Tamaño de halo de actividad (mm)	Tamaño de colonia (mm)	Degradación (%)
	Almidón	10	35	71.4
	Caseína	8	15	46.7
	Tween 80	6	18	66.7
	Lecitina	6	34	82.4
	Gelatina	6	28	78.6
	Celulosa	10	34	70.5
	DNA	9	20	55

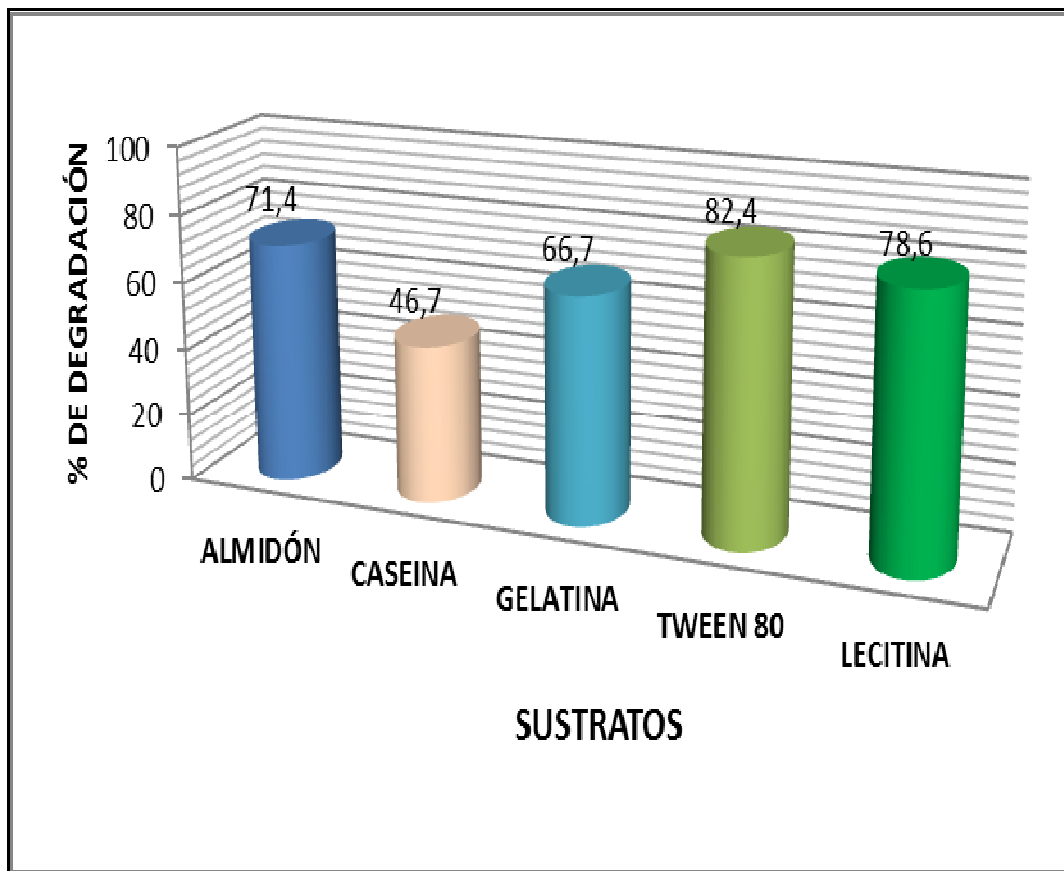


Figura 5. Resumen de la capacidad multienzimática del actinomiceto seleccionado cepa 13A-2.

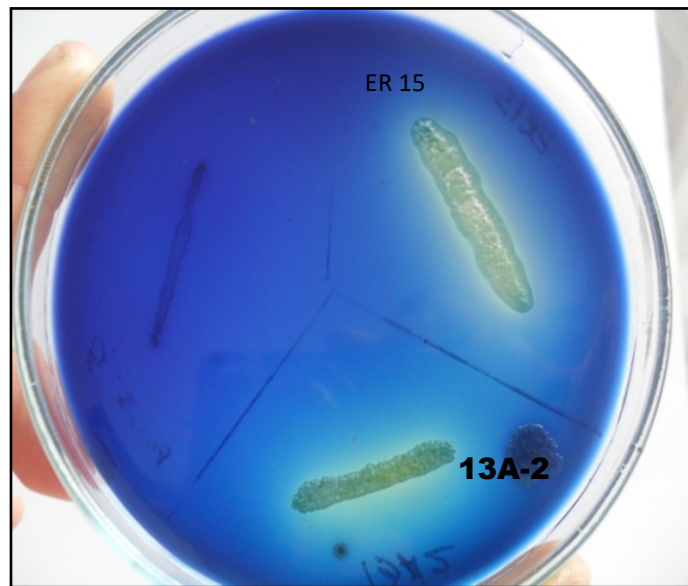


Figura 6. Degradación de DNA por parte de la cepa 13A-2.

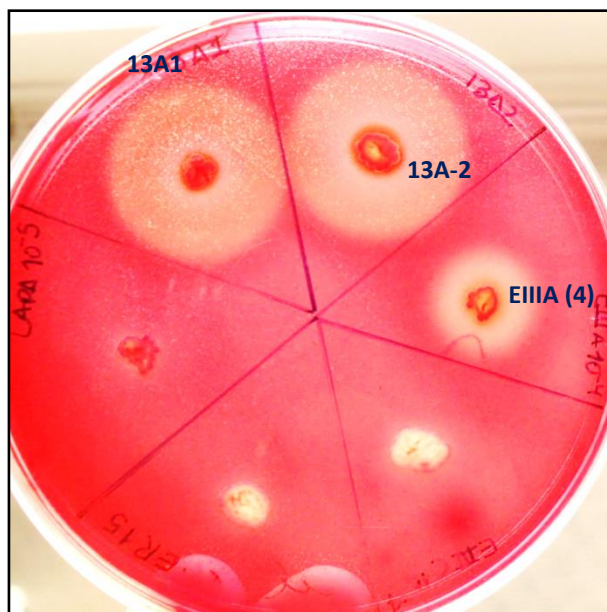


Figura 7. Degradación de celulosa por algunos actinomicetos marinos en el que destaca la cepa en estudio 13A-2.

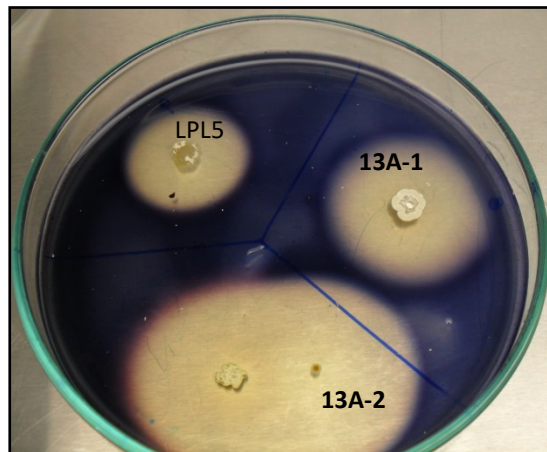


Figura 8. Halo de aclaramiento, alrededor de las colonias de actinomicetos en el medio con almidón, lo que evidencia la degradación de este sustrato. Se utilizó el colorante Lugol para revelar tal actividad.

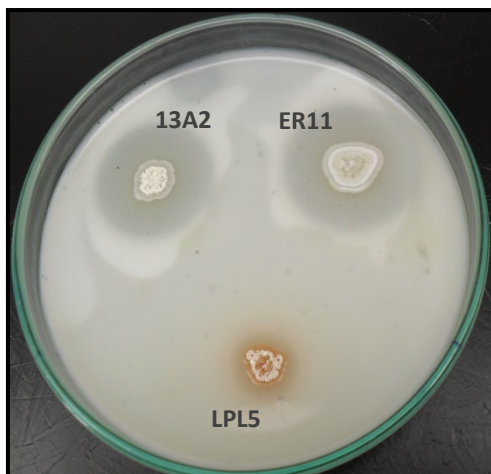


Figura 9. Halo de proteólisis de la caseína provocada por 3 cepas de actinomicetos incluida 13A-2. Tinción con bicloruro mercurio.

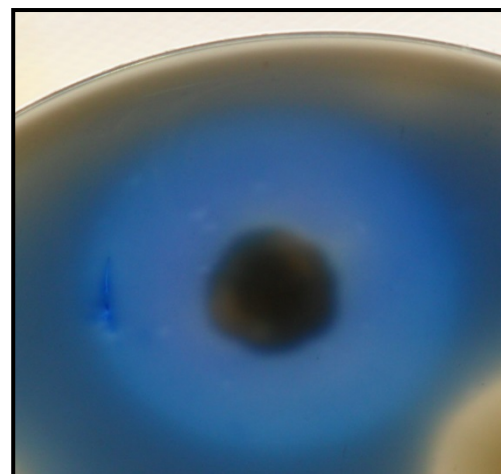


Figura 10. Hidrólisis de la caseína provocada por la cepa 13A-2. Tinción con azul de lactofenol.

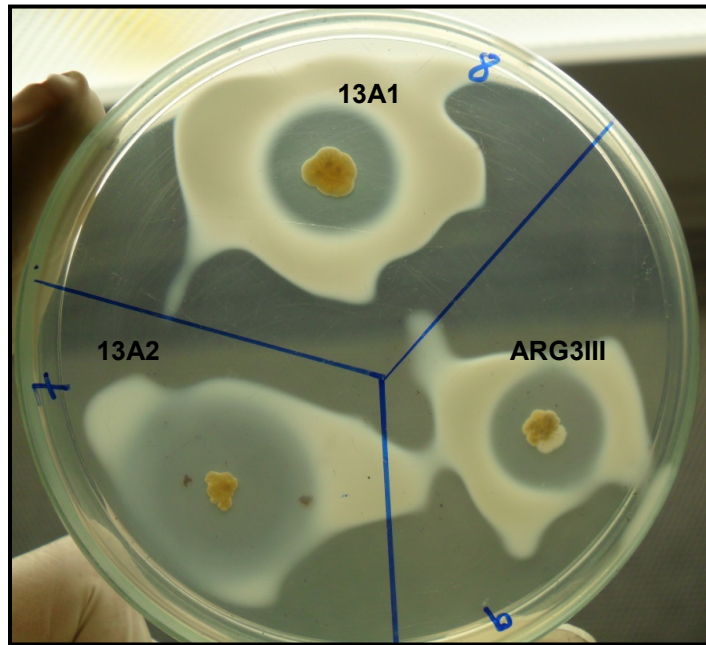


Figura 11. Halos provocados por la cepa 13A-2 en el medio con gelatina en comparación con otras cepas (no consideradas en el presente estudio). Tinción con bicloruro de mercurio

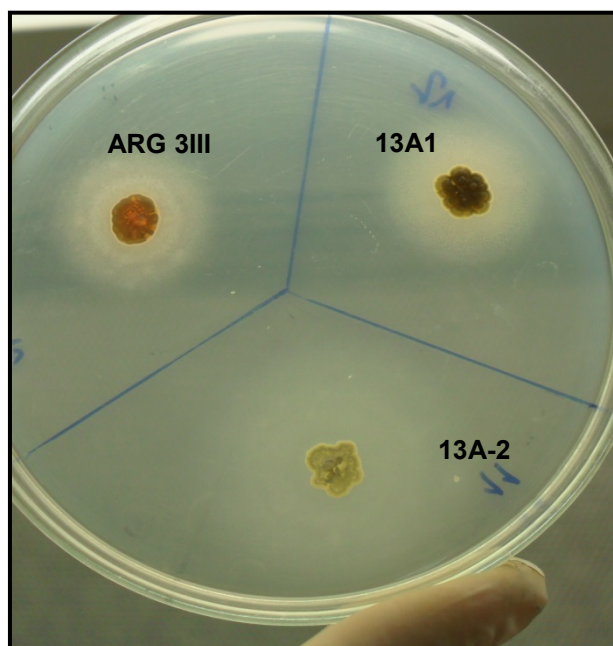


Figura 12. Opalescencia del medio alrededor de las colonias de actinomicetos en Agar Tween 80, que incluye la cepa 13A-2 que indican actividad lipolítica provocada por las tween esterases.

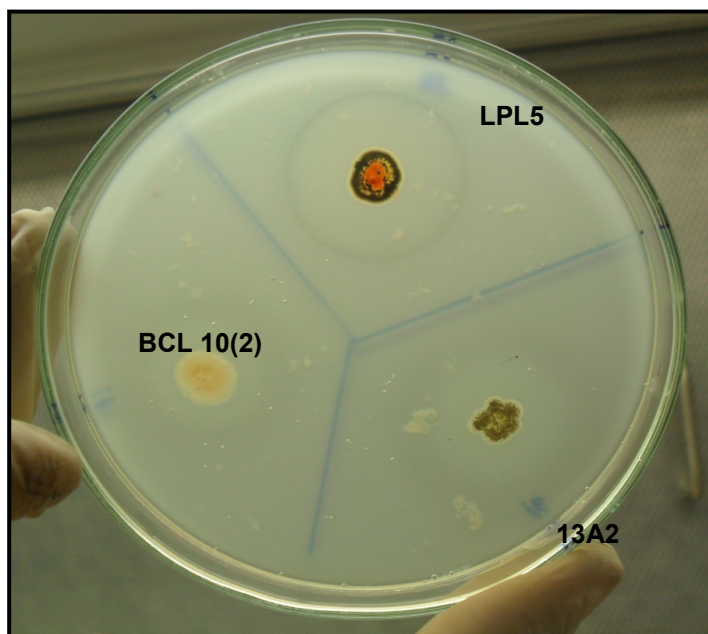


Figura 13. Halos provocados por degradación de lecito-vitelina presente en la yema de huevo, actividad evaluada en 3 cepas de actinomicetos incluyendo el actinomiceto 13A-2.

7.3 Pruebas de antagonismo primario frente a bacterias estándar ATCC y selección del mejor actinomiceto antagonista.

De los actinomicetos evaluados, pero no consignados en el presente trabajo, fue la cepa 13A-2 la que logró los mayores porcentajes de inhibición contra *E. coli* ATCC 25922, con actividades de hasta el 61%. Algunos fueron comparativamente similares respecto a la actividad antimicrobiana, pero en menor porcentaje. Asimismo, la cepa 13A-2 presentó la mejor actividad antimicrobiana contra la cepa testigo Gram positiva, la cual fue inhibida con mayores porcentajes en comparación a *E. coli* ATCC 25922 (Tabla 5, Figura 14).

Debido a que esta cepa, actinomiceto 13A-2, presentó los mejores resultados de antagonismo fue la que se seleccionó y por lo tanto se tuvo que prescindir de los otros actinomicetos.

Posteriormente con esta cepa se realizaron los ensayos de caracterización fenotípica, enfrentamiento contra cepas β -lactámico-resistentes y también la extracción y caracterización de sus antimicrobianos mediante PAGE-SDS y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se detallarán en los siguientes puntos.

Tabla 5. Actividades antimicrobianas de actinomicetos de origen marino evaluados para la selección de la cepa 13A-2.

<div> <div>CEPAS TESTIGO</div> <div>ACTINOMICETOS</div> </div>	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (%)	
ER15	0	60
ER11	0	55
ER14	0	0
ARG-12	0	0
13A-2 (*)	61	74
BCL10(-2)	0	60
LPL-5	0	65
ER13	0	0
ER06	0	0
13-A1	49	63
ARG-3	0	0
ARG-3III	0	0
ARG-1II	0	0
ARG-2II	0	52
ARG-4III	0	0
ARG-5II	0	0
ARG6-II	0	0
ARG11-II	0	0
ARG13-II	0	49
ARG16-II(2)	0	0
EIIC10(-4)22	0	46
EIIIA10(-4)	38	57
EIIC10(-4)	0	42
AN8-ESP1	0	38
EIIA-10(-3)	0	0
EIIB-10(-3)	0	0
LAPA10(-5)	0	58

(*) La cepa 13A-2 fue seleccionada para el presente estudio luego de la evaluación conjunta de otros actinomicetos de origen marino (no contemplados en el presente trabajo).

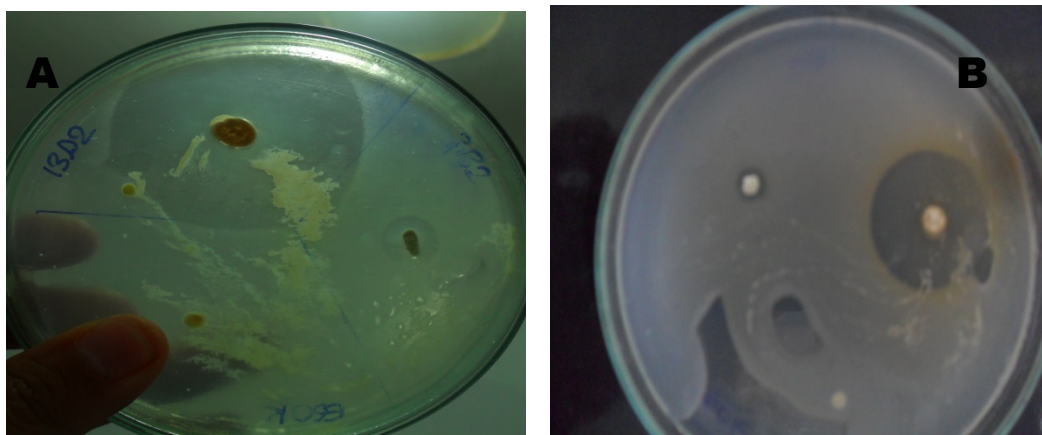


Figura 14. Actividad antimicrobiana del actinomiceto 13A-2 contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (A) y *E. coli* ATCC 25922 (B). Se puede observar la efectividad antimicrobiana frente a estas dos cepas estándar. Prueba realizada sobre agar marino.

7.4 Pruebas de antagonismo del actinomiceto 13A-2 frente a *E.coli* ATCC 25922 y *E.coli* ATCC 8739 usando diferentes medios de cultivo.

El actinomiceto 13A-2 tuvo una respuesta variada según el medio de cultivo donde se realizó el ensayo, así se pudo confirmar que en el medio ECOLINO 322 sin proteínas se produjeron los mayores halos de inhibición, mejorando el rendimiento de actividad antimicrobiana en comparación con los otros medios evaluados, los cuales son nutritivamente más ricos (Tabla 6 y Figuras 15 y 16).

A continuación se resumen los resultados de este estudio:

Tabla 6. Comparación de la actividad antimicrobiana de la cepa 13A-2 en diferentes medio de cultivo. Pruebas realizadas por triplicado.

EVALUACIÓN COMPARATIVA DE LA CAPACIDAD ANTAGONISTA DE LA CEPA 13A2 EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO CON 3 REPETICIONES													
		AGAR ECOLINO 322			AGAR ECOLINO 322 +EL			TSA			AGAR MARINO		
E. coli ATCC	# REPETIC	COLONIA	HALO	%INHIBIC	COLONIA	HALO	%INHIBIC	COLONIA	HALO	%INHIBIC	COLONIA	HALO	%INHIBIC
8739	1	5	18	68,8	7	12	41,6	8	15	46,6	6	16	58,3
	2	7	20		6	(-)		10	(-)		6	14	
	3	7	20		5	(-)		10	(-)		8	18	
E. coli ATCC 25922	1	4	17	71	6	8	25	7	10	30	7	14	50
	2	7	30		5	(-)		12	(-)		8	16	
	3	4	10		6	(-)		10	(-)		5	(-)	

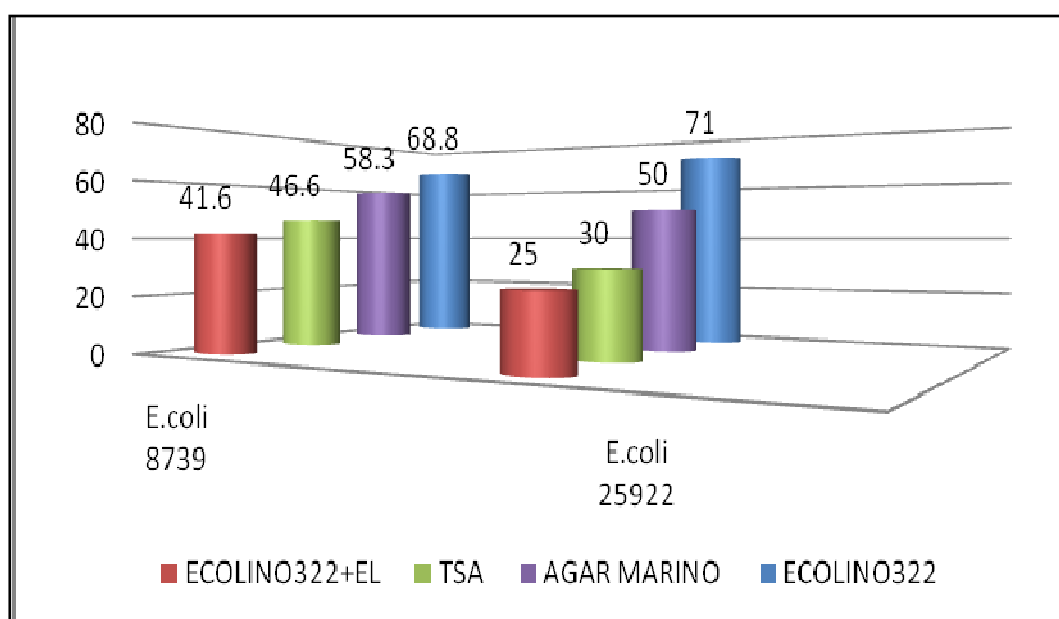


Figura 15. Porcentajes de inhibición de la actividad antimicrobiana de la cepa 13A-2 sobre cepas ATCC.

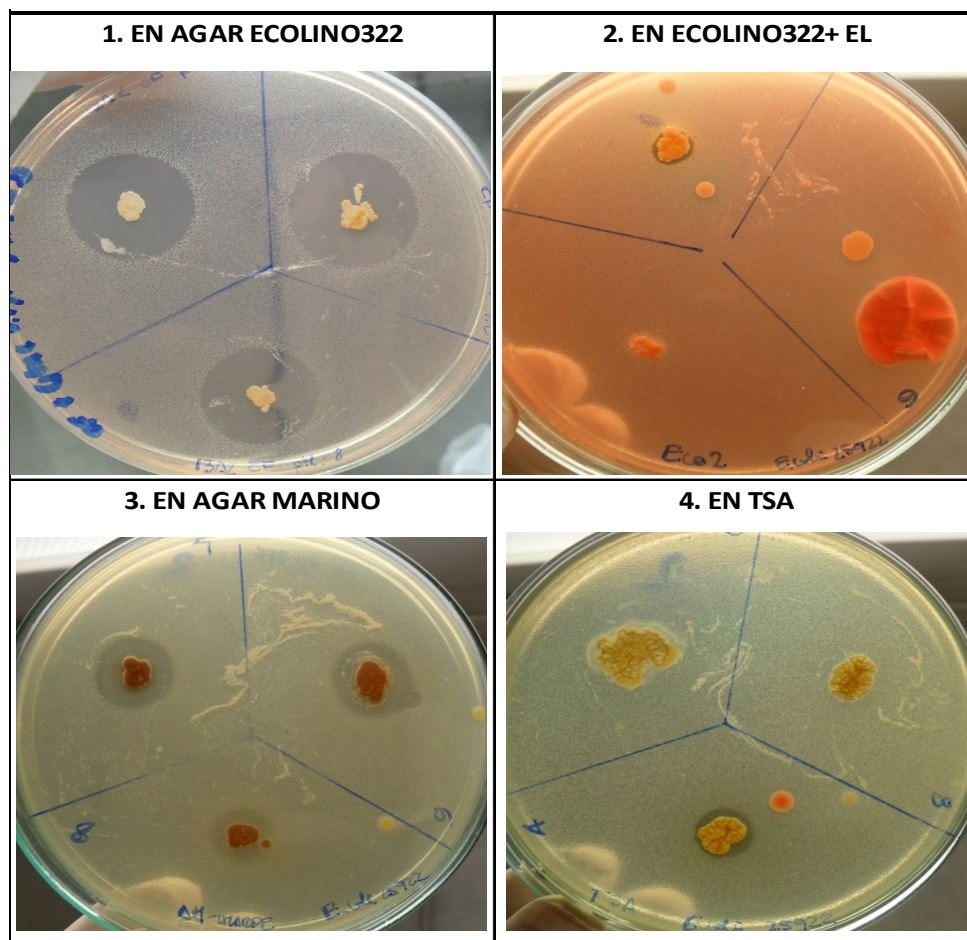


Figura 16. Evaluación de la actividad antagonista de la cepa 13A-2 en diferentes medios de cultivo. Cada prueba se evaluó por triplicado. El medio EcoLino322 es un medio sin fuentes nitrogenadas. EL: extracto de levadura.

7.5 Pruebas de antagonismo del actinomiceto seleccionado 13A-2 frente a bacterias β -lactámico-resistentes

El actinomiceto 13A-2 mostró buena actividad antagonista contra las 16 cepas β -lactámico-resistentes, con halos de actividad que alcanzaron hasta 46 mm de diámetro en Agar Marino, siendo las cepas *Klebsiella sp.* BLEE y *Proteus sp.* AmpC las que mostraron mayor resistencia a la inhibición (Tabla 7). Sin embargo, estas mismas fueron inhibidas en mayor porcentaje cuando las evaluaciones se realizaron en el medio ECOLINO 322. Dicha mejoría fue notoria contra todas las cepas β -lactámico-resistentes; ya que en todas las

pruebas los porcentajes de inhibición aumentaron desde unos pocos 12 mm en Agar Marino a unos 22 mm de diámetro en el medio ECOLINO 322 (Tabla 7 y Figuras 20 y 21).

Los porcentajes de inhibición evaluados mediante las pruebas de bicapa en el medio ECOLINO 322 superaron el 60% en todos los casos y en 10 de las 16 cepas enfrentadas; este porcentaje se elevó por encima del 75%, llegando en algunos casos hasta el 84,2 % de inhibición (Tabla 7). En cambio, los resultados en Agar Marino fueron distintos, donde 15 de las 16 cepas resultaron con porcentajes menores o iguales al 50%.

Por esto se observó un mejor rendimiento en EcoLino 322 con un aumento de porcentajes por encima de 200 % contra la cepa *Klebsiella sp.* BLEE y mayor a 150% contra *Proteus sp.* ampC. En el caso de las cepas *E. coli* BLEE mejoraron desde menores a 100% hasta mayores de 150% (Tabla 6 y Figuras 18 y 19).

Se comprobó que las colonias del actinomiceto 13A-2 crecidas sobre el medio ECOLINO 322 tuvieron un tamaño igual o menor que en Medio Marino, sin embargo las actividades antimicrobianas fueron notoriamente mayores sobre el primer medio, por lo que los nutrientes presentes en este medio están influenciando positivamente la producción de antimicrobianos (Figura 20).

Tabla 7. Actividad antimicrobiana de la cepa 13A-2 contra 16 cepas β lactámico- resistentes (aisladas de pacientes con infección a las vías urinarias).

* Cepas referenciales ATCC no β -lactámico- resistentes.

	AGAR MARINO			AGAR ECOLINO-322			
Cepas Testigo	Colonia (mm)	Halo (mm)	INHIBICIÓN (%)	COLONIA (mm)	HALO (mm)	INHIBIC. (%)	Rendimiento (%)
<i>*E.coli</i> ATCC 25922	10	20	50	5	26	80,7	61,4
<i>*St. aureus</i> ATCC 25923	8	35	77,1	7	36	80,5	4,4
<i>E.coli</i> BLEE	8	13	38,4	6	38	84,2	119,2
<i>E.coli</i> BLEE	10	26	61,5	5	20	75	21,9
<i>E.coli</i> BLEE	7	15	53,3	5	22	77,2	44,8
<i>E.coli</i> BLEE	8	16	50	4	14	71,4	65,6
<i>E.coli</i> BLEE	9	17	35,2	8	25	68	93,1
<i>E.coli</i> BLEE	10	14	28,5	6	22	72,2	153,3
<i>Klebsiella sp.</i> BLEE	10	12	16	8	22	63,6	290,75
<i>E.coli</i> BLEE	8	16	50	4	22	81,8	63,6
<i>Proteus sp.</i> AmpC	10	13	23	4	12	66,6	189,56
<i>E.coli</i> BLEE	11	19	42,1	6	30	80	90
<i>E.coli</i> BLEE	9	16	43,7	5	25	80	83
<i>E.coli</i> BLEE	9	14	35,7	5	25	80	124
<i>E.coli</i> BLEE	10	17	41,1	4	17	76,4	85,8
<i>E.coli</i> BLEE	11	15	26,6	5	25	80	200
<i>E.coli</i> BLEE	10	20	50	6	23	73,9	47,8
<i>E.coli</i> BLEE	9	15	40	8	46	82,6	106,5

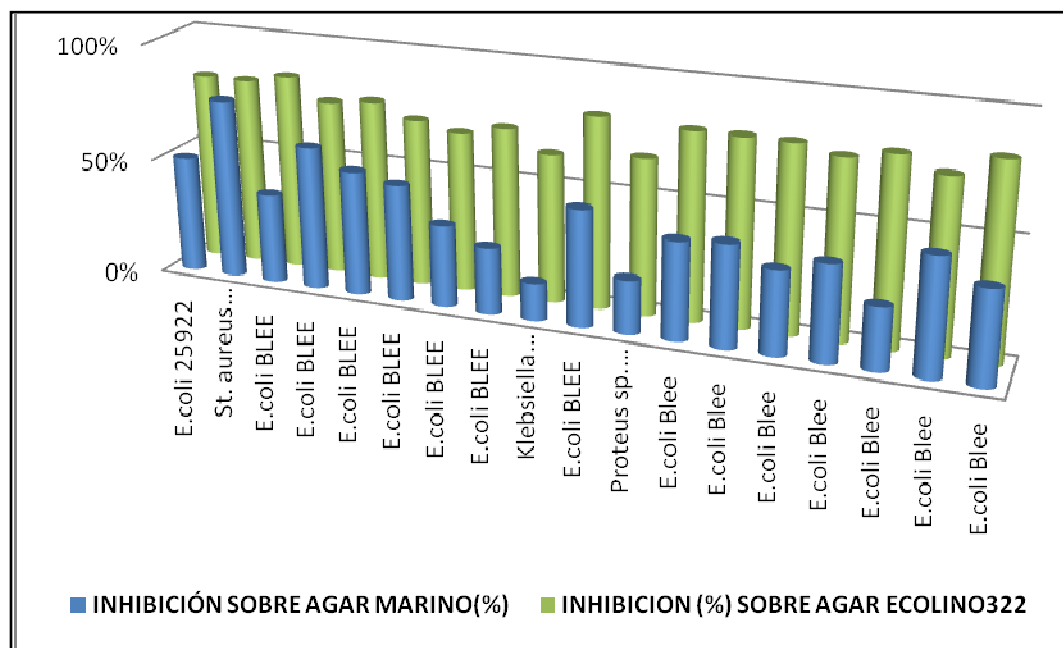


Figura 17. Porcentaje de inhibición comparativa de la actividad antagonista de la cepa 13A-2 contra β -lactámico-resistentes.

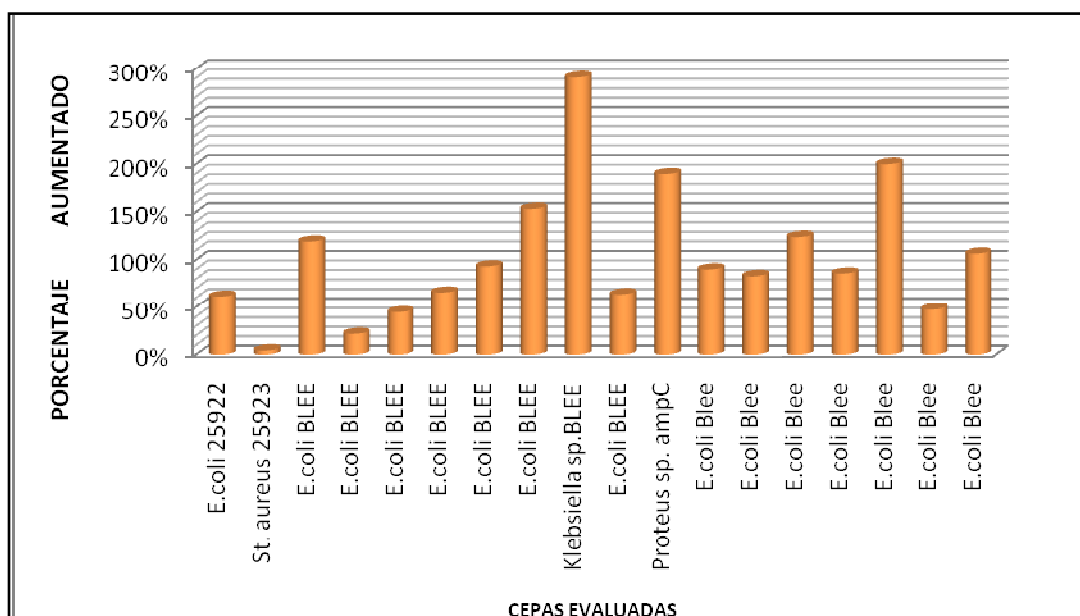


Figura 18. Porcentaje de inhibición que aumento en el medio ECOLINO 322 con respecto al Medio Marino. Se puede observar que las actividades antimicrobianas mejoraron hasta en más del 200 % cuando los ensayos se realizaron sobre el medio ECOLINO 322.

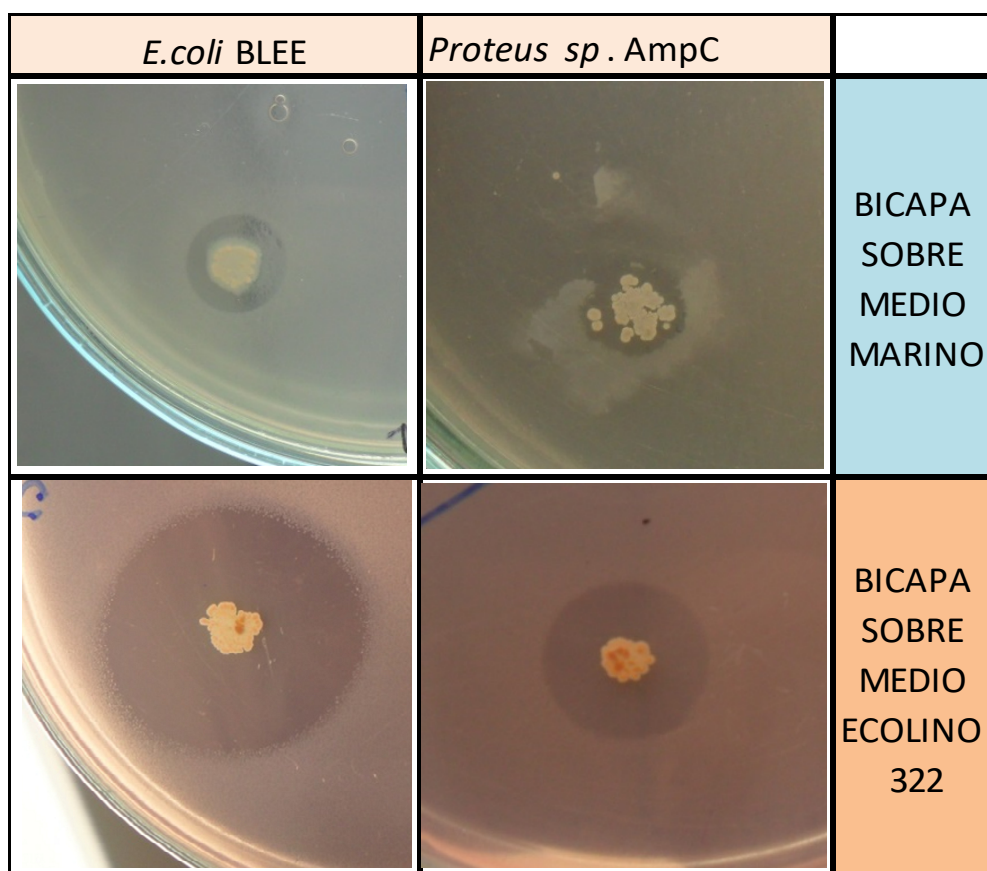


Figura 19. Comparación de los halos provocados por el actinomiceto 13A-2 sobre *E.coli* BLEE y *Proteus sp. ampC* en 2 medios diferentes medios. Evaluación mediante técnica de bicapa.

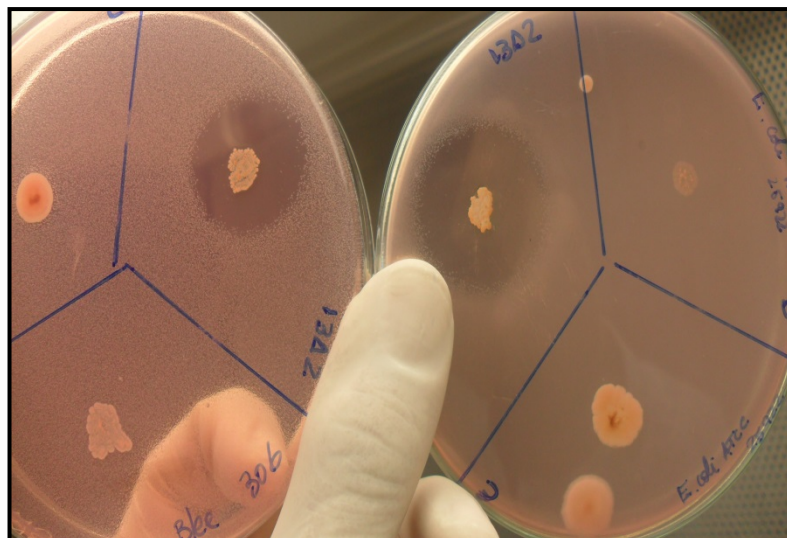


Figura 20. Comparación de tamaño de halo provocado por la cepa 12A-2 frente a *E.coli* BLEE (izquierda) y otra *E.coli* ATCC 25922 (derecha). Obsérvese una ligera variación respecto al tamaño de los halos de actividad antimicrobiana. Evaluación mediante técnica de bicapa en Agar ECOLINO 322.

7.6 Identificación genotípica de la cepa de actinomiceto13A-2.

Mediante la amplificación del gen que codifica ARNr 16s y el posterior secuenciamiento nos arrojó que la cepa 13A-2 pertenece al género *Streptomyces* sp. y al parecer se trataría de una nueva especie (Figura 21).

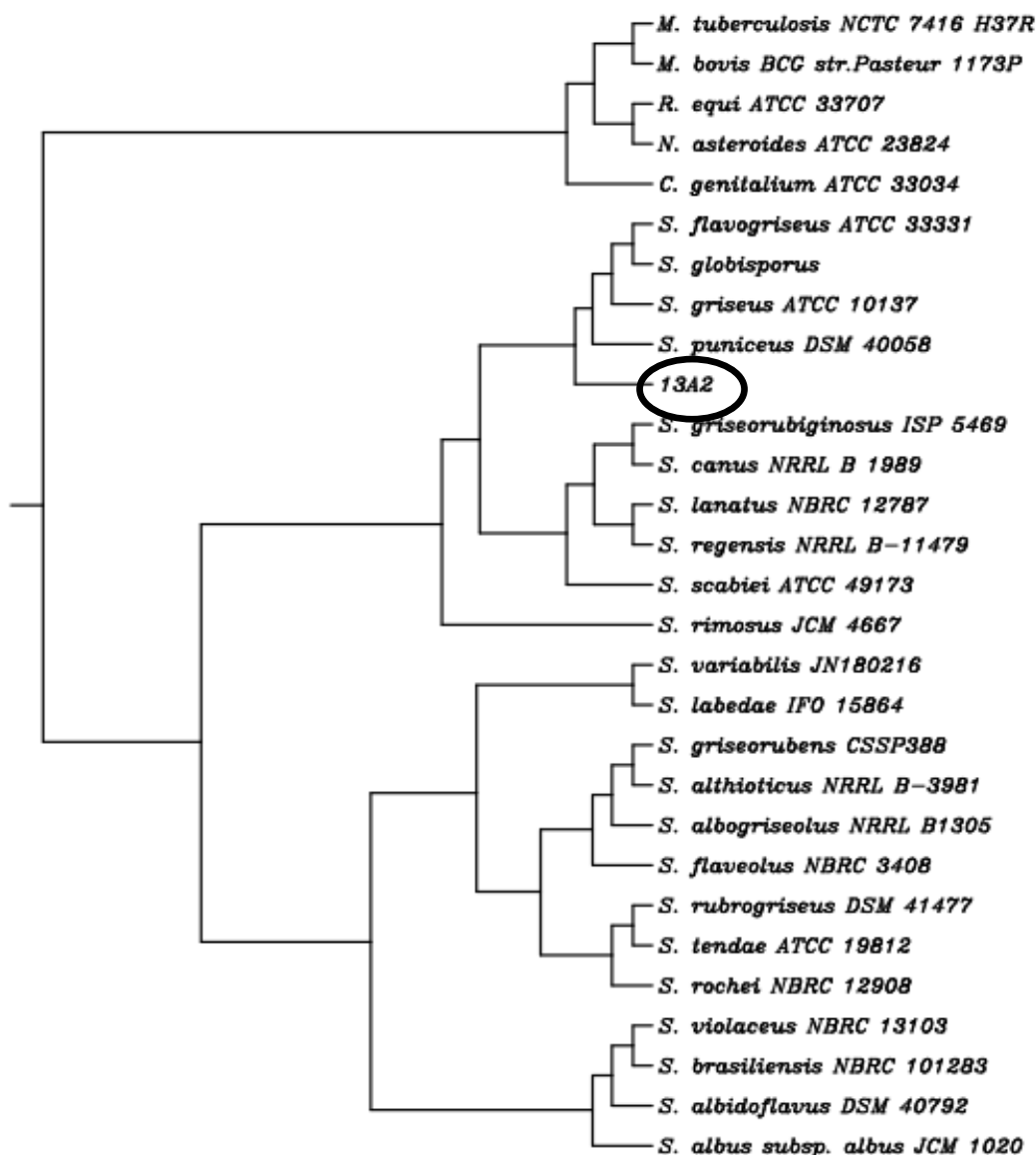


Figura 21. Árbol filogenético donde se resalta que la cepa en estudio pertenece al género *Streptomyces*; sin embargo, se trataría de una nueva especie no registrada hasta la actualidad.

7.7 Caracterización preliminar de compuestos antibacterianos

7.7.1 Proceso fermentativo

Después de los 12 días de fermentación de la cepa 13A-2 en los diferentes medios de cultivo se obtuvo que de los 3 caldos utilizados fue el Caldo Marino simple y el caldo ECOLINO 322 (nuevo) los que demostraron una mayor

concentración de antimicrobianos a diferencia del Caldo Marino compuesto, siendo este último donde no se observó halos de actividad. Fue muy evidente esta actividad de los sobrenadantes contra las cepas referenciales *E. coli* 25922 ATCC y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, con una mayor inhibición sobre esta última cepa testigo (Figura 22).

7.7.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los sobrenadantes

La evaluación antimicrobiana de los sobrenadantes de la cepa 13A-2 frente a las 16 cepas testigo β -lactámico-resistentes de origen clínico arrojó resultados confirmatorios de las pruebas anteriores. Los resultados mostraron halos de inhibición mayores en las cepas *E.coli* BLEE en comparación con *Proteus sp.* Ampc y *Klebsiella sp.* BLEE, con halos de hasta 21 mm en el primer caso mientras que contra *Proteus sp.* Ampc fue de 15 mm (Figura 23).

Por otro lado, mediante la técnica en pocillos se confirmó que la producción de los antimicrobianos ocurren a partir del quinto día de fermentación. Esto es usando el caldo ECOLINO 322 como medio de crecimiento de la cepa 13A-2 (Figuras 26 y 27).

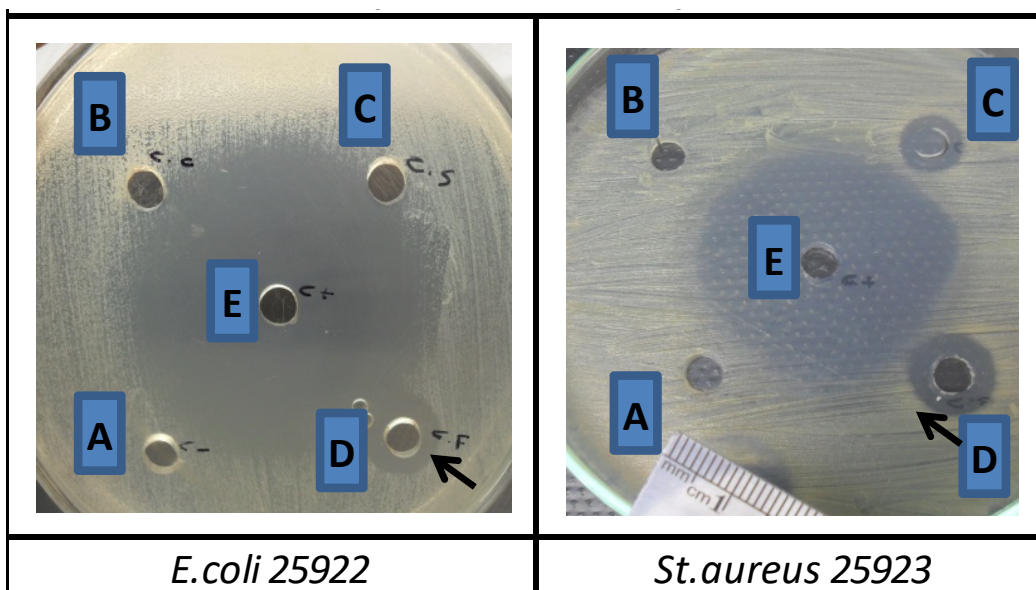


Figura 22. Comparación de la actividad antimicrobiana frente a testigos estándar de los sobrenadantes obtenidos por fermentación de la cepa 13A-2 (sin el uso de solventes). Obsérvese la presencia de halos de aclaramiento. **A:** control negativo (C-); **B:** caldo marino compuesto (C.C); **C:** caldo marino simple (C.S); **D:** caldo formula nueva (C.F) denominado EcoLino 322 y **E:** control positivo (C+) gentamicina 160mg /2ml).

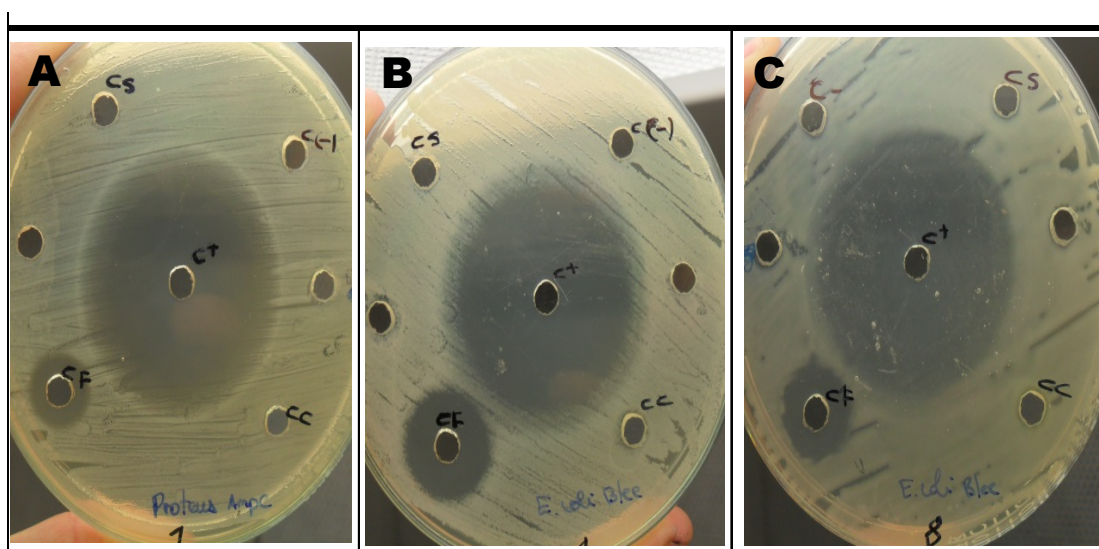


Figura 23. Comparación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de la cepa 13A-2 (flecha) contra β -lactámico resistentes. Halos de 14 mm contra *Proteus sp. ampC* (A). Halos de 22mm contra *E. coli BLEE* (B) y otra cepa *E. coli BLEE* (C) con halos de 17mm.

7.7.3 Extracción y caracterización de compuestos antimicrobianos

Con la selección del caldo marino simple y ECOLINO 322 como los mejores medios de fermentación para obtener actividad antimicrobiana considerable se procedió a evaluar dichos compuestos mediante 2 procedimientos, cuyos resultados se muestran a continuación.

A) Búsqueda de compuestos antibacterianos no péptidicos.

A.1.- Extracción química de compuestos bioactivos

En la obtención de extractos crudos, es decir usando los solventes orgánicos para extraer los principios activos (Figura 24), se pudo observar que los solventes orgánicos necesitaban un tiempo considerable para poder ser evaporados después de mezclarlos con los sobrenadantes, además de todos estos compuestos fue el diclorometano el que presentó los mejores características ya que no es muy tóxico y puede evaporarse con facilidad por encima de los 40⁰ C , pero estas cualidades no son determinantes en la elección de los solventes ya que lo más importante de un solvente es que retenga el o los metabolitos de nuestro interés lo cual no ocurrió como se detallará más adelante.



Figura 24. Proceso de extracción de los metabolitos mediante solventes orgánicos. **A:** sobrenadante con etil acetato y sobrenadante con diclorometano, obsérvese los solventes que son totalmente claros. **B:** Mezcla de los 2 compuestos por 1 hora a 600 revoluciones por minuto. **C:** Metabolitos retenidos en los respectivos solventes evidenciados por el notorio cambio de color en comparación con **A**. Luego se evaporaron en rotavapor y fueron re-suspendidos en DMSO 5% para obtener los extractos crudos los cuales fueron probados como se observa en la Figura 25.

A.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos crudos.

Los extractos crudos obtenidos mediante el uso de solventes fueron evaluados mediante la técnica en pocillos, comprobándose que la actividad antimicrobiana no pudo manifestarse ya que no se observaron resultados esperados, ya que ningún solvente fue capaz de extraer los antimicrobianos a pesar que se usaron solventes de diferente polaridad tales como etanol, n-butanol (polares), diclorometano y etil acetato (polaridad intermedia); éter etílico y hexano (no polares). Así se comprobó que ninguno fue capaz de concentrar y mantener la actividad en forma de extractos crudos, ya que la actividad de estos extractos

fue nula en comparación con los sobrenadantes evaluados en los que no se usaron solventes (Figura 25).

Estos resultados permiten inferir que los solventes afectarían negativamente la actividad de los antimicrobianos.

Debido a que no fue posible concentrar los antimicrobianos usando los solventes orgánicos, no fue posible establecer pesos ni concentraciones específicos para la realización del MIC (Concentración mínima inhibitoria) con lo cual este paso se obvio y se prosiguió con el procedimiento de búsqueda de antimicrobianos de naturaleza peptídica que se detalla en el siguiente punto.

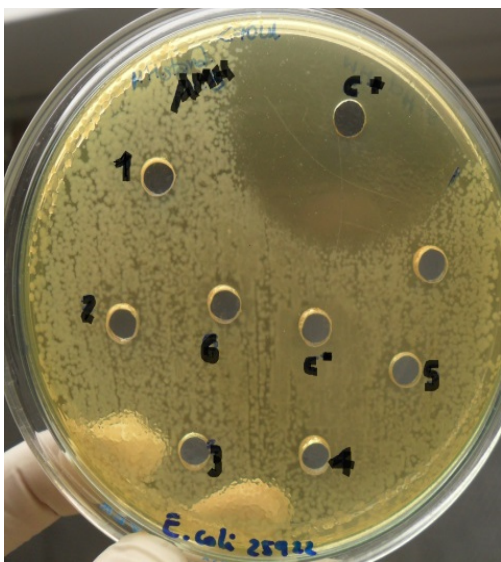
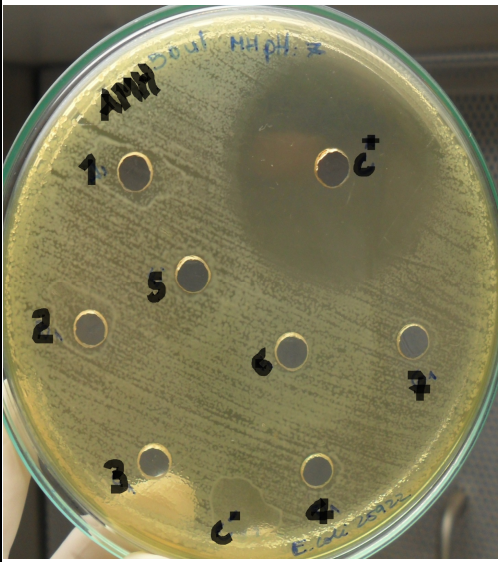
EC obtenidos de Caldo Marino	EC obtenidos de Ecolino322	cepa testigo
		<i>E.coli</i> ATCC 25922

Figura 25. Comparación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos (EC) usando solventes orgánicos. Obsérvese que solo hay actividad en el control (+) debido a que los solventes no capturaron los antimicrobianos presentes en los sobrenadantes. 1: Etanol; 2:Etil acetato; 3: Etanol; Butanol; 6: Control negativo, Control positivo, /2ml) 4:Diclorometano; 5: Hexano; (C-): DMSO 10% (C+): gentamicina (160 mg

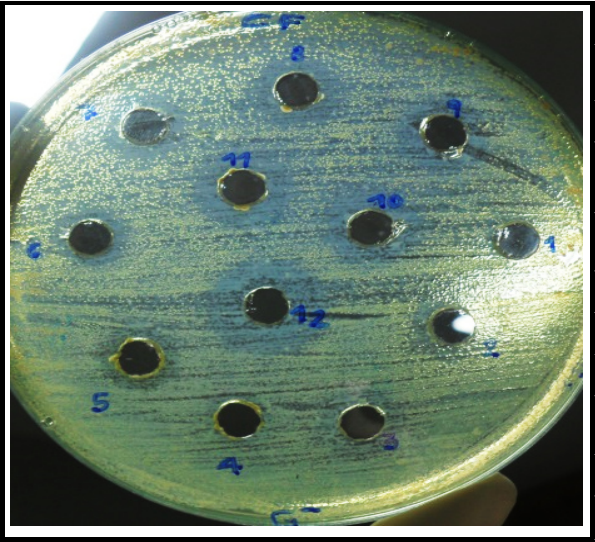


Figura 26. En esta prueba de pocillos se confirma que la actividad antimicrobiana aparece al quinto día en los sobrenadantes obtenidos por fermentación en caldo ECOLINO 322. La cepa testigo es *E. coli* ATCC 25922. Además se confirma que dicha actividad va aumentando conforme avanzan los días. Los números del 1al 12 indican los días de fermentación.

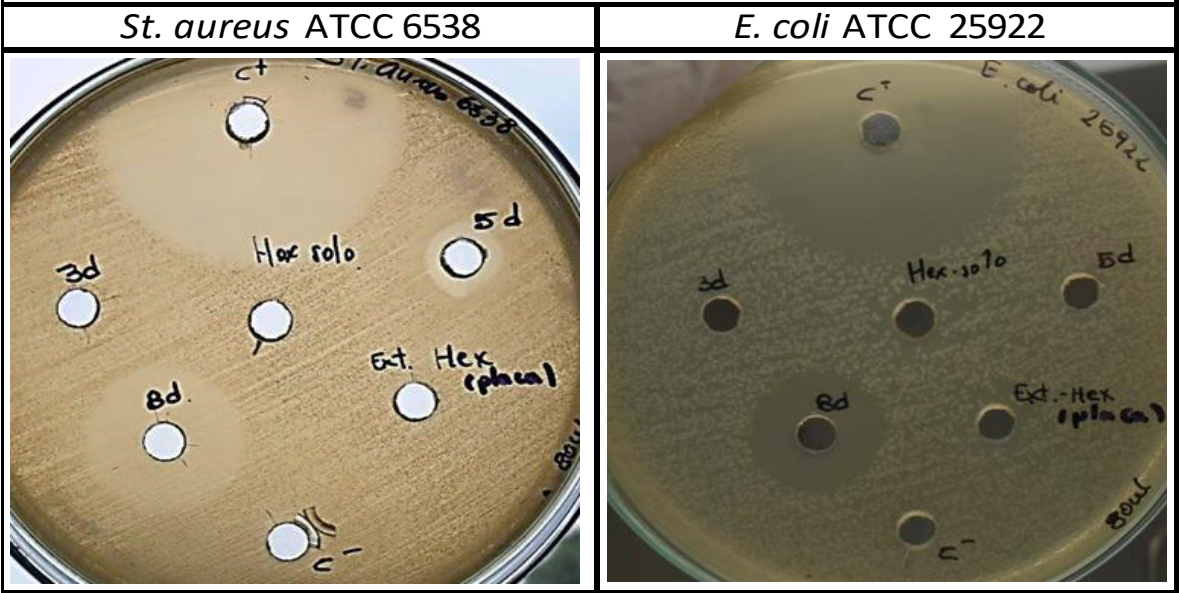


Figura 27. Se confirma que la producción de los antimicrobianos aparece a partir del quinto día de fermentación, pero recién en el 8vo día se ve inhibición contra la cepa Gram negativa. **3d; 5d; 8d:** indican los días de fermentación; **Hex-solo:** Hexano como control (-); **Ext-Hex:** Extracto obtenido a partir de Hexano y resuspendido en 1mL DMSO 10%; **C-:** Control negativo; **C+:** control positivo (gentamicina 160mg/MI).

Tabla 7. Valores promedio del pH medido durante los días del proceso fermentativo de la cepa 12A-2.

CALDO MARINO				CALDO ECOLINO 322			
Tiempo-horas	pH L1	pH L2	PROMEDIO	Tiempo-horas	pH L1	pH L2	PROMEDIO
0	7,12	7,1	7,11	0	7,15	7,13	7,14

24	6,8	6,81	6,81	24	6,78	6,78	6,78
48	7,9	7,91	7,91	48	6,83	6,84	6,84
72	8,2	8,28	8,24	72	6,94	6,95	6,95
96	7,8	7,97	7,89	96	6,73	6,77	6,75
120	8,03	8,08	8,06	120	6,68	6,68	6,68
144	8,47	8,2	8,34	144	6,48	6,77	6,63
168	8,25	8,27	8,26	168	7,05	7,07	7,06
192	8,21	8,24	8,23	192	7,15	7,2	7,18
216	8,44	8,43	8,44	216	6,6	6,7	6,7
240	8,29	8,3	8,3	240	7,16	7,2	7,18
264	8,37	8,41	8,39	264	7,12	7,11	7,12
288	8,36	8,39	8,38	288	7,22	7,31	7,27

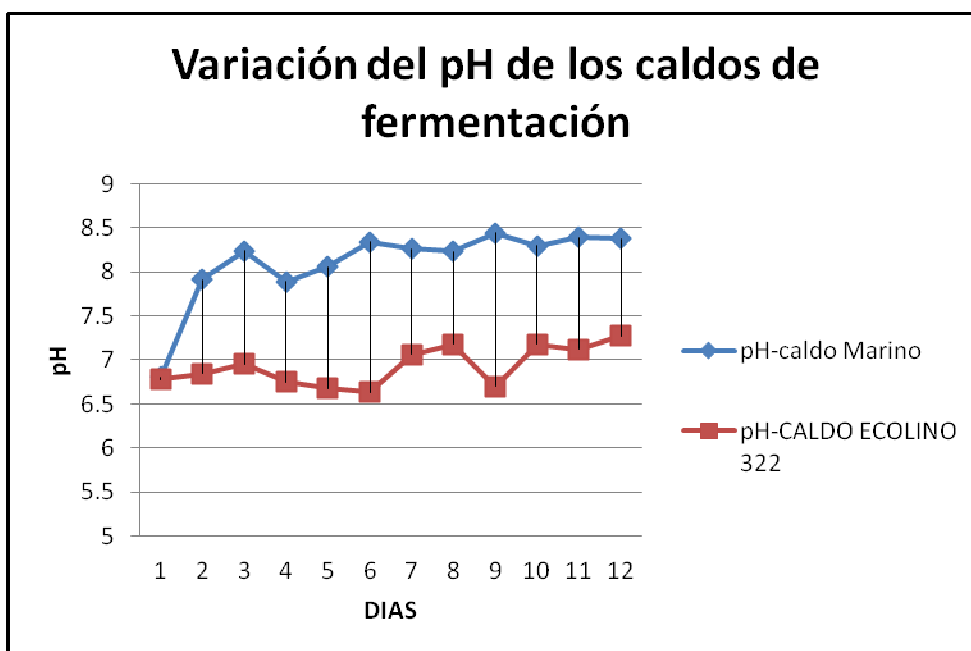


Figura 28. Evaluación del pH durante todo el proceso fermentativo del actinomiceto cepa 13A-2, tanto en el caldo marino como ECOLINO 322.

B) Búsqueda de compuestos antibacterianos de naturaleza peptídica

B.1 Evaluación cualitativa de proteínas

Mediante la técnica de Bradford se pudo determinar cualitativamente la presencia de proteínas en los sobrenadantes de 5 y 8 días de fermentación, los cuales presentaban halos de inhibición, pero no en los sobrenadantes de 3 días, aquel que no presentó halos de inhibición, reforzando así la idea de que se trataría de compuestos antimicrobianos de naturaleza proteica.

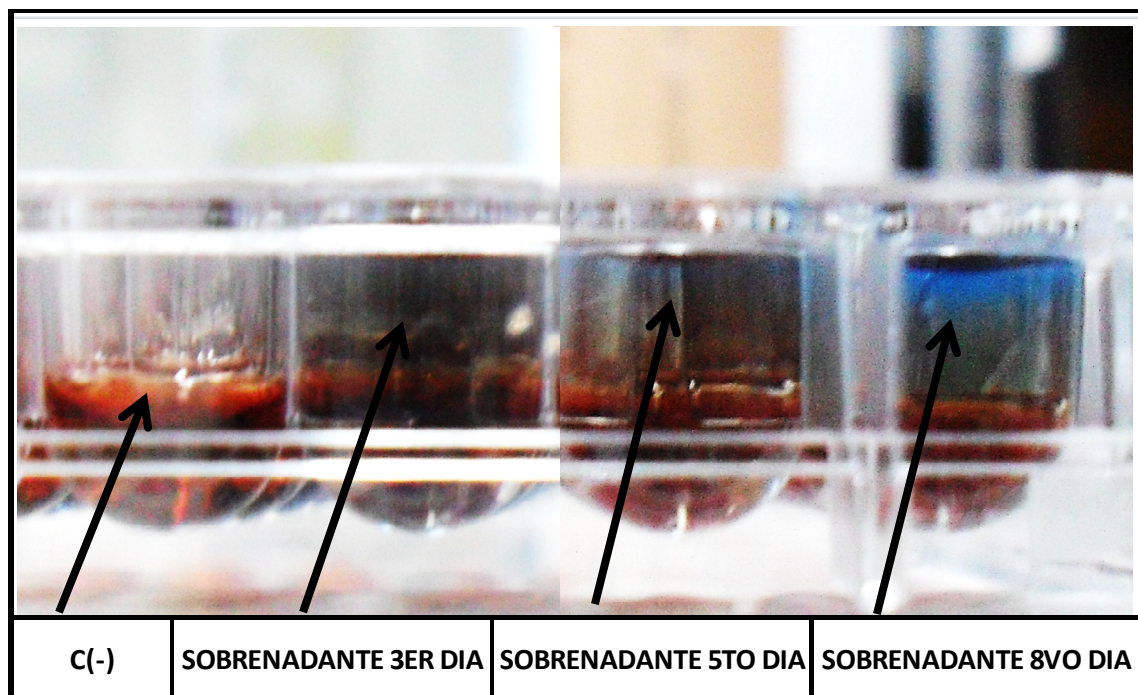


Figura 29. Mediante Bradford se detectó cualitativamente la presencia de proteínas (color azul) en el último pocillo de la microplaca, el cual resultó ser el sobrenadante de 8 días, en el de 5 días también se puede apreciar pero muy tenuemente. En el de 3 días no hay proteínas.

B.2 Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de péptidos en los sobrenadantes de 8 días con actividad antimicrobiana, es decir los que mostraron halos de inhibición, arrojó una concentración de 7 $\mu\text{g/mL}$ de proteínas totales. Debido a que nuestro caldo en su forma natural presenta un color rojizo, este arroja un valor cuando se hace la

lectura con Qubit fluorometer, aun cuando no tiene ningún día de fermentación, por ello el valor de concentración final se halló restando al sobrenadante en el tiempo de 8 días de fermentación, el valor obtenido del sobrenadante de 0 días (Tabla 8).

Tabla 8. Determinación de la cantidad de proteínas totales presentes en los sobrenadantes con actividad antimicrobiana.

CUANTIFICACIÓN CON QUBIT FLUOROMETER			
CONCENTRACIONES (µg/mL)			
SOBRENADANTE - 0 DIAS	SOBRENADANTE 8 DIAS		FINAL
12.6	19.6		7.0

B.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS)

Mediante PAGE-SDS se pudo apreciar la presencia de 5 bandas en el carril 10, que fue uno de los 2 carriles donde no hubo tratamiento con calor (95°C). Los pesos moleculares de estas bandas se calcularon entre 40 y 50 KDa. El carril 10 nos permite diferenciar 2 bandas que se encuentran notoriamente

definidas con respecto a las otras 3 que se ven muy tenues y las cuales no se aprecian en los carriles que se trataron con calor (del 1 al 8) (Figura 31).

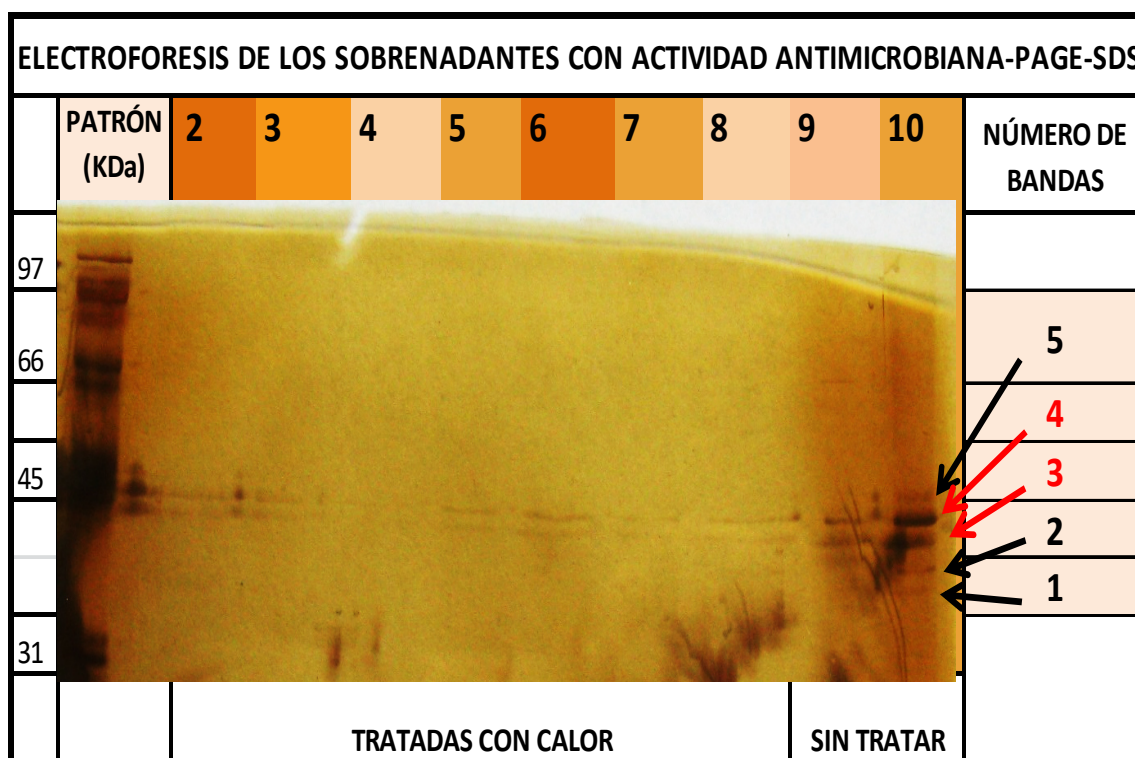


Figura 30. Se Observa la presencia de 5 bandas en el carril 10, de las cuales 2 están notoriamente definidas, mientras que las otras 3 se ven tenues. PAGE-SDS teñidas con nitrato de plata. Los carriles del 1 al 10 fueron de sobrenadantes del décimo día de fermentación.

7.7.4 Caracterización preliminar de los antimicrobianos utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Debido a que los extractos crudos obtenidos no presentaron actividad antimicrobiana como se ha demostrado en los ensayos mediante técnica de pocillos, se trabajó con los sobrenadantes ya que estos sí presentaron buena actividad tanto contra las cepas ATCC como contra las β -lactámico-resistentes; por lo tanto se realizó la caracterización de estos compuestos los cuales tenían el antecedente de presentar 5 péptidos en PAGE-SDS.

El análisis HPLC nos permitió confirmar la presencia de más de 4 compuestos con tendencia a la no polaridad. A continuación se muestran los cromatogramas de cada sobrenadante evaluado.

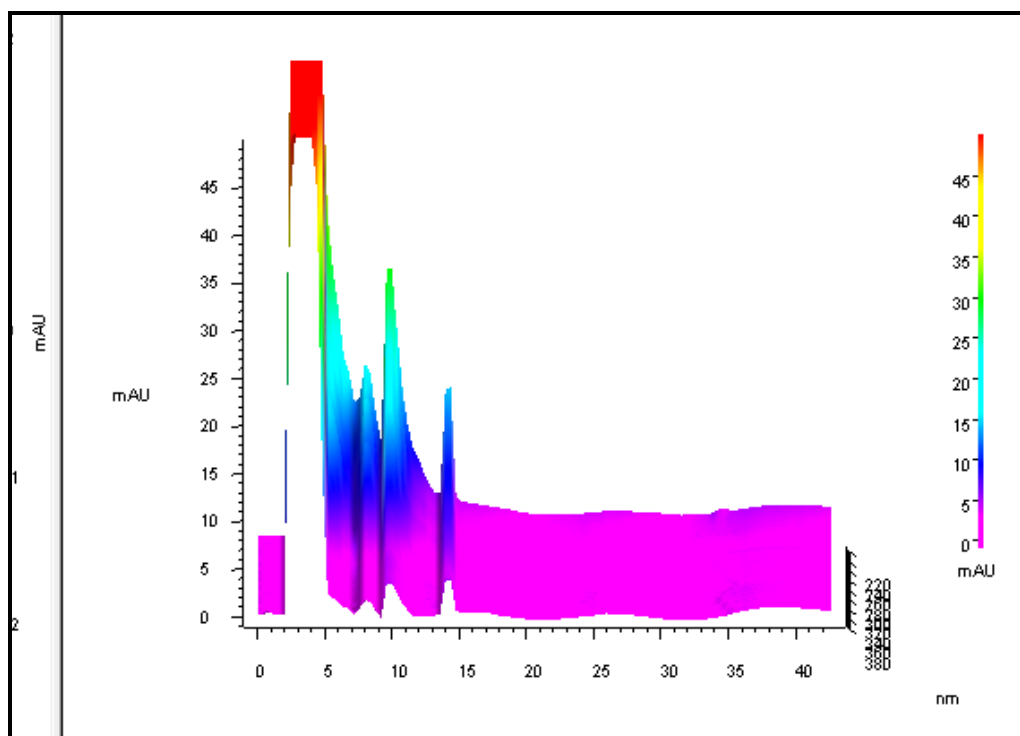


Figura 31. Cromatograma en 3D de los sobrenadantes de 8 días de fermentación. Los picos representan la cantidad de compuestos presentes en la muestra evaluada.

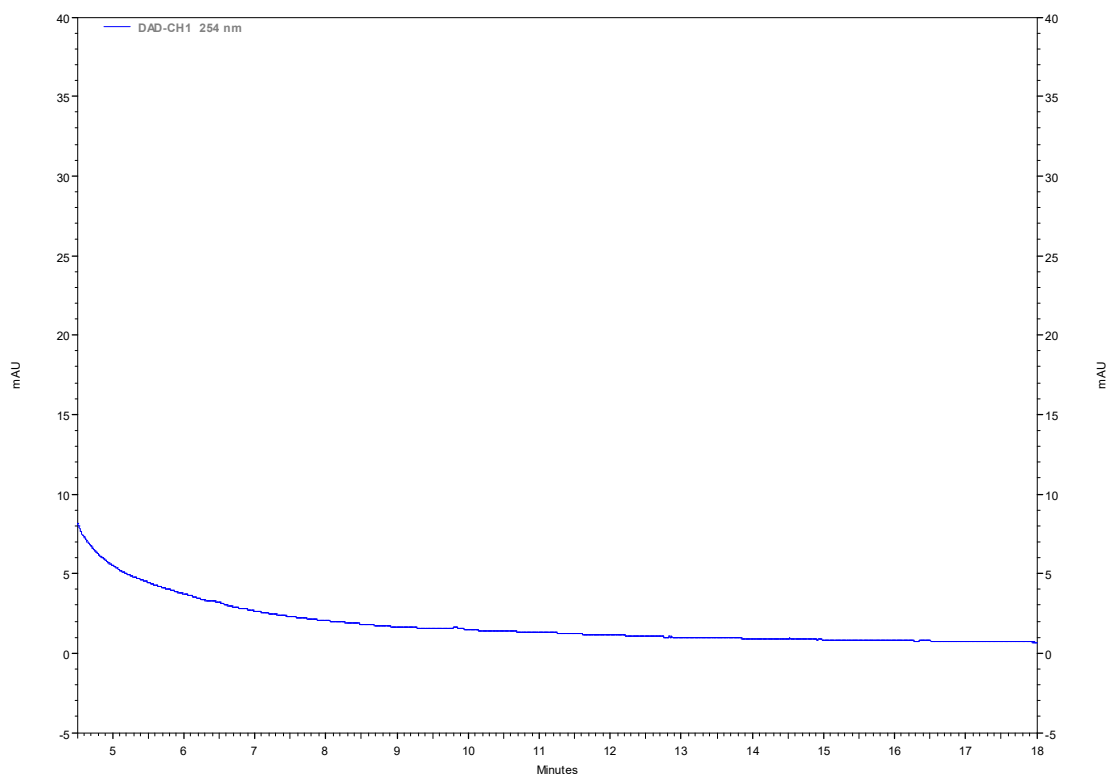
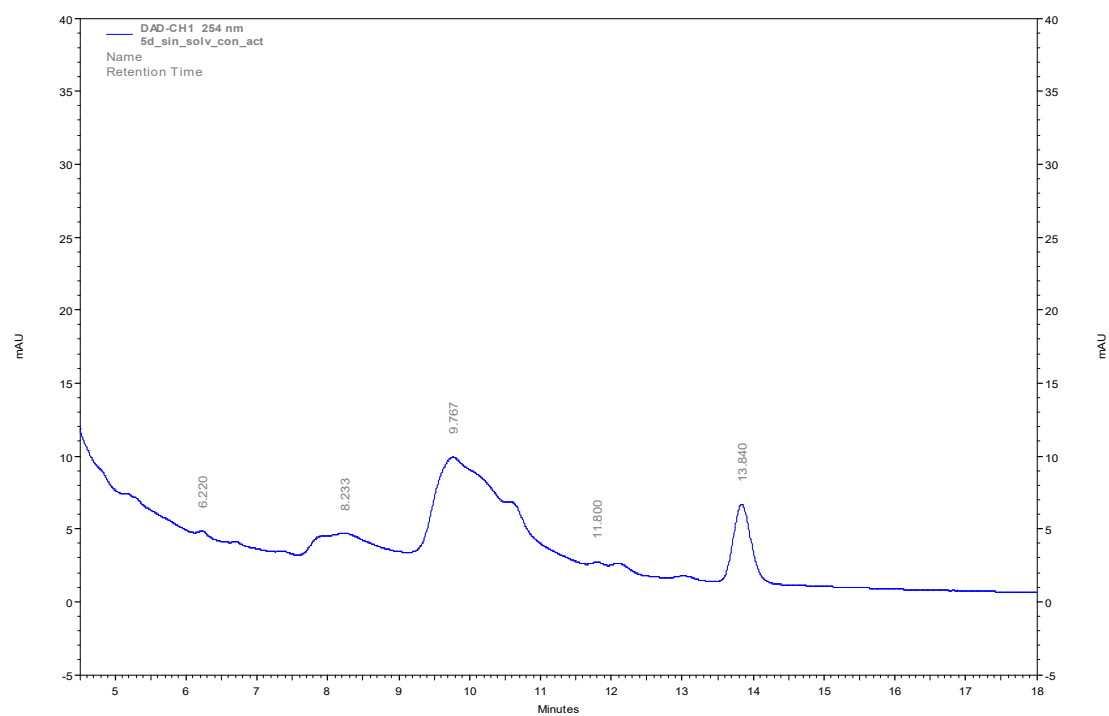


Figura 32. Cromatograma luego del tercer día de fermentación. No hay evidencias de



picos.Figura 33. Cromatograma al quinto día de fermentación, con presencia de 5 picos muy bien definidos.

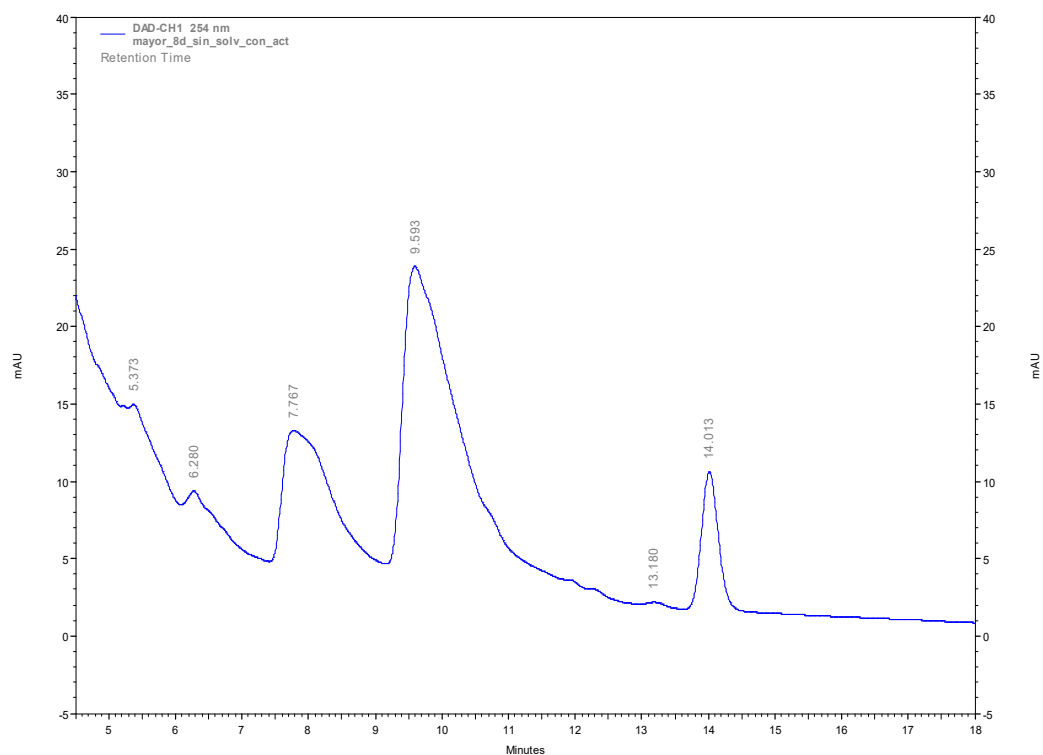


Figura 34. Cromatograma mostrada despues de ocho días de fermentación con presencia de hasta 6 picos.

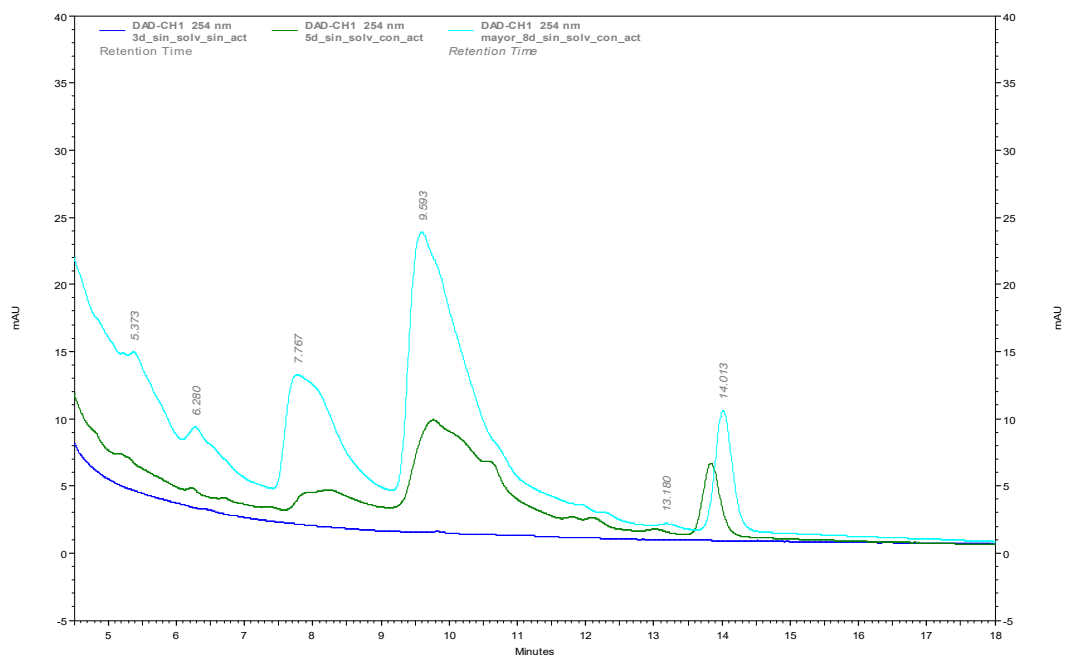


Figura 35. Cromatograma conjunta de los sobrenadantes a los 3, 5 y 8 días de fermentación.

8. DISCUSIÓN

Las evaluaciones de las características fenotípicas son muy importantes cuando se estudia los metabolitos secundarios de interés producidos por

microorganismos, tales como los actinomicetos, así lo demuestran diferentes autores como Sathiyaseelan *et al.*, (2011) y Bavya *et al.*, (2011); es por ello que las primeras evaluaciones de nuestra cepa en estudio fueron las características fenotípicas tales como de crecimiento (Figuras 3 y 4), así como las características fisicoquímicas (Tabla 3). Esto nos permitió conocer mejor a nuestro actinomiceto, además nos permite obtener mejores resultados en los ensayos posteriores; por ejemplo, nos permite conocer que nutrientes, como aminoácidos o carbohidratos, se puede agregar o cual no al medio de fermentación elegido, también nos permite saber si la degradación de estos nutrientes están variando el pH y por lo tanto afectando el crecimiento microbiano que a su vez puede afectar la producción de antimicrobianos en el proceso fermentativo.

Este proceso también nos ayudó a conocer que a temperatura ambiente (15 a 25 C⁰) nuestro microorganismo crecerá sin inconvenientes, esta parte es importante ya que en los procesos fermentativos realizados en el presente trabajo que se detallaran líneas adelante, no controlamos la temperatura pues todo el ensayo se realizó a la temperatura ambiente antes mencionada.

Todas estas consideraciones nos ayudan a ahorrar tiempo, evitar ensayos en vano y sobretodo producir mayores cantidades de metabolitos bioactivos de nuestro interés, que en este caso serían los antimicrobianos.

Esta etapa de caracterización también ayuda a tener una noción preliminar del tipo de antimicrobianos que se está secretando, ya que nos permitirá conocer la posible naturaleza de los metabolitos que el actinomiceto está secretando en los caldos de fermentación; puesto que si empezamos el proceso de

fermentación en un caldo que carece de fuentes nitrogenadas y al cabo de unos días de crecimiento se detecta compuestos de naturaleza proteica deduciríamos que estos fueron producidos por el microorganismo, todo esto se discutirá con mayor detalle en los puntos posteriores.

El actinomiceto seleccionado presentó elevada actividad multienzimática tanto para degradar péptidos, polisacáridos y sustancias de naturaleza lipídica, ya que fue capaz de degradar los 6 sustratos evaluados (almidón, caseína, tween 80, lecitina, gelatina y DNA) por lo que podemos deducir que nuestro actinomiceto secreta enzimas extracelulares tales como amilasas, proteasas, esterases, Dnasas, lecitinasas (Figuras 5 -13). Esto está fundamentado por el hecho de que nuestra cepa en estudio ha sido aislado del interior de los tejidos de un invertebrado marino (esponja), en donde se encuentra estableciendo una posible estrecha relación simbiótica, ya que son estos actinomicetos y otros grupos microbianos que se encuentran establecidos como parte de la flora bacteriana normal de los invertebrados marinos como esponjas, erizos, etc. microorganismos que son capaces de degradar una gran parte de biomoléculas que ingresan como parte de la alimentación de estos organismos filtradores, produciendo moléculas más simples, facilitándoles así una mejor y más fácil absorción de nutrientes (Ashaet *al.*, 2011 & Cheshire *et al.*, 2007). Por ello, antes de evaluar la actividad antimicrobiana del actinomiceto en estudio, también fue necesario conocer sus características bioquímicas; es decir, su arsenal multienzimático. Son tan importantes estas evaluaciones que casi todos los trabajos donde se evalúa la capacidad antimicrobiana de

actinomicetos marinos, realizan las evaluaciones de los aspectos bioquímicos que pueden o no presentar los microorganismos que se están evaluando.

Mohanet *al.*, 2008 comprobaron la muy buena capacidad de sus actinomicetos marinos para degradar almidón, caseína, lípidos y diferentes azúcares y aminoácidos, así también demostraron que sus cepas con mejor actividad antimicrobiana desarrollan mejor a temperaturas entre los 30^o y 40^oC y a pH entre los 7,0 a 9,0. Esto refuerza los resultados obtenidos en el presente estudio donde se obtienen valores muy similares (Tablas 3 y 4). La diferencia entre sus resultados y los nuestros es que la cepa que seleccionaron pudo degradar el aminoácido no polar fenilalanina mientras que nuestra cepa seleccionada, no lo hizo, además en su estudio no se observó actividad celulolítica de su cepa como sí ocurrió en nuestras evaluaciones.

Como vemos en el punto 7.3 se necesitó realizar una evaluación preliminar para poder seleccionar al actinomiceto que presente los mejores porcentajes de inhibición (Tabla 5) de estos resultados se observó que el actinomiceto 13A-2 fue la cepa que produjo la mayor inhibición tanto a la cepa testigo *Escherichia coli* ATCC 25922 como a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (Figura 14).

Del 27 actinomicetos marinos evaluadas preliminarmente (no contemplados en el presente trabajo), es decir antes de enfrentarlas a las 16 β -lactámico resistentes obtuvimos que la cepa 13A-2 mostró la mejor actividad

antimicrobiana en comparación a los demás actinomicetos y que fue motivo para elegirla como cepa de estudio y codificada como 13A-2.

De estos resultados podemos deducir que el 48%, es decir 13 cepas fueron capaces de secretar antimicrobianos (Tabla 5) y de estos, 3 actinomicetos es decir 11%, fueron capaces de producir inhibición contra la cepa Gram negativa *E. coli* ATCC 25922. Obteniéndose mejores resultados en comparación al estudio realizado por Selvakumaret *al.*, 2010 quienes obtuvieron 7 cepas antagonistas de un total de 94 aislados, obteniendo un rendimiento menor con solo el 7 %. Mientras que Mohan *et al.* , 2008 lograron un rendimiento de 18,8% de un total de 64 actinomicetos de origen marino, de las cuales solo 2 cepas es decir el 3,1% presentó actividad de amplio espectro.

León *et al.*, (2007) obtuvieron un mayor rendimiento de un total de 62 actinomicetos marinos evaluados, 36 cepas (59%) mostraron actividad antibacteriana pero frente a *Pseudomonas aeruginosa* multidrogoresistente diferente a la cepa gram negativa que nosotros hemos evaluamos la cual fue *E.coli* ATCC 25922.

En el año 2011 Asha y colaboradores lograron un rendimiento de 14,2 % aislando 4 cepas con capacidad antagonista contra 3 tipos de cepas testigo Gram negativas patógenas de humanos entre las que destacaron *E. coli*, *Pseudomonas spp.* y *Vibrio cholerae*, mostrando halos de inhibición de hasta 15 mm, resultados que se encuentran por debajo de los obtenidos en este trabajo donde se logran halos de hasta 30 mm con colonias de actinomicetos

mucho más pequeñas, estos resultados se evidenciaron en el medio ECOLINO 322 que fue el nuevo medio formulado por el autor de este trabajo (Tabla 6).

León *et al.*, (2007) y Aponte (2011) trabajando con varios actinomicetos de origen marino y un solo actinomiceto marino respectivamente lograron actividades antimicrobianas tanto contra Gram positivos y Gram negativos pero con porcentajes de inhibición menores a los obtenidos en el presente trabajo, sin embargo, las cepas Gram negativas fueron diferentes, siendo la cepa utilizada por León *et al.*, *Pseudomonas aeruginosa*, en tanto Aponte utilizó *E.coli* 302 ambos de origen clínico.

En cuanto a los medios de cultivo evaluados queda demostrado que el medio ECOLINO322 es un medio que potencia la actividad antimicrobiana de los actinomicetos cuando se realizan las pruebas de bicapa, en comparación con otros medios comerciales tales como el Agar Marino y el TSA (Figura 15 y 16). El fundamento que se utilizó para elaborar este nuevo medio es que la cantidad de nutrientes debe ser tal que no sólo permita el crecimiento de los actinomicetos sino que además permita llevarlos al estrés, el mismo que se presentó después de los primeros 3 días de crecimiento, cuando empezaron a agotarse los nutrientes y empezó la fase de diferenciación celular, es decir la formación de formas filamentosas y abundantes micelios (Figura 3). Esto se logró con una cantidad de nutrientes limitantes, ya que nuestro medio contiene sales y azúcares pero no proteínas, componentes que sí presentan medios como el Agar Marino y TSA. Por lo tanto, el medio ECOLINO 322 provocó un estrés por falta de nutrientes lo cual permitió desencadenar señales para los

actinomicetos en crecimiento y así activar los genes que participan en la síntesis de antibióticos. Esto representa uno de los valores agregados de este nuevo medio de cultivo además de ser barato y fácil de elaborar.

Al igual que en otros trabajos se ha comprobado que la síntesis de metabolitos secundarios coincide generalmente con el comienzo de la diferenciación morfológica y la formación del micelio aéreo, que según nuestros resultados lo podemos apreciar después del tercer día, y se hace muy notorio después de las 120 h, al quinto día de la fase de crecimiento (Figura 3). Estos dos procesos muestran elementos comunes de regulación génica, regulación que está mediada por sustancias indicadoras que se producen durante la fase de diferenciación morfológica según lo ha comprobado Hopwood, (1988).

Existen otras investigaciones en donde concuerdan que la expresión de un grupo de genes reguladores (específicos y globales) y consecuentemente el comienzo de la biosíntesis de antibióticos está determinado e influenciado por gran variedad de factores fisiológicos y medioambientales entre los que destacan: la tasa de crecimiento del microorganismo, moléculas de señalización, desequilibrio del metabolismo y varios tipos de estrés fisiológico (Bibb, 1996).

Mascher *et al.*, (2006) trabajando con *Streptomyces coelicolor* determinaron que este mecanismo de regulación en la producción de antimicrobianos está

dirigido por sistemas de 2 componentes. En estos sistemas participan 2 tipos de proteínas una que actúa a nivel de membrana como sensor de señal medioambiental, que son las HK histidinkinasa y las RR regulador de respuesta que actúa a nivel intracelular.

En los genomas bacterianos, hay una media de 10 a 50 sistemas de dos componentes (Szurmant *et al.*, 2007). Además, los sistemas de dos componentes se han relacionado con múltiples procesos celulares incluyendo división celular, motilidad, formación de biofilm, comunicación intercelular, etc. (Groban *et al.*, 2009), entre los cuales cabe destacar aquellos relacionados con la virulencia de algunos microorganismos patógenos y con la resistencia a antibióticos. Esta característica, junto con su ausencia en el reino animal, los convierte en atractivas dianas antimicrobianas (Watanabe *et al.*, 2008; Gotoh *et al.*, 2010).

Yepes (2010) en su trabajo de tesis logró demostrar la importancia del sistema de dos componentes en cepas mutantes de *Streptomyces coelicolor* M45, las cuales al tener afectado dicho complejo también se veía afectada la producción de antibióticos como la Actinorrodina.

En la literatura científica hay numerosos estudios en donde se explica la importancia del estrés ambiental y su relación con los sistemas de 2 componentes así como otros sistemas enzimáticos en la biosíntesis de antimicrobianos, pero coincidimos con lo argumentado por Martínez-Antonio y Collado-Vides (2003), en cuanto a que la regulación de la biosíntesis de

antibióticos es una complejísima red interconectada a varios niveles la cual necesita un estudio completo de cada ruta para poder comprenderla.

Por lo anterior queda demostrado que no siempre un medio con alto contenido de proteínas ya sea en caldo o agar, producirá una alta producción de metabolitos, tales como antibióticos, sino que podemos aprovechar el estrés que la falta nutrientes pueda provocar para desencadenar un conjunto de señales que permitirá una mayor producción de antimicrobianos, obteniendo así mejores rendimientos en la producción de antimicrobianos, como lo demuestran los resultados de la Figuras 17 y 18.

De los resultados anteriores se pudo elegir al medio Marino y al medio ECOLINO 322 como los mejores medios para continuar las evaluaciones de antibiosis contra las cepas patógenas β -lactámico-resistentes.

Los resultados de actividad antimicrobiana mejoraron considerablemente en el medio ECOLINO con respecto a medio Marino (Tabla 7), cuando las evaluaciones se realizaron contra las bacterias patógenas β -lactámico-resistentes, lo cual demuestra la importancia de los nutrientes como promotores de una mejor producción de antimicrobianos (Figuras 17 – 20). Queda demostrado con nuestros resultados de la Tabla 7 que no siempre una colonia muy grande producirá los mejores halos de inhibición, ya que todas las colonias crecidas sobre agar ECOLINO 322 fueron más pequeñas que aquellas que crecieron sobre Agar Marino sin embargo los halos más grandes se evidenciaron en el primer medio mencionado.

Es así como podemos aprovechar los nutrientes en los procesos de fermentación líquida, sometiendo al actinomiceto en estudio a un estrés

nutricional quitándole las fuentes nitrogenadas y permitiendo así mayor producción de antimicrobianos.

Wang *et al.*, (2008 & 2010); Jia *et al.*, (2009) lograron demostrar que las fuentes carbonadas, como las que ofrecen los carbohidratos, son uno de los componentes más significantes tanto para la producción de energía, la síntesis de biomasa y producción de metabolitos secundarios.

El análisis molecular nos permitió distinguir a nuestra cepa 13A-2 como *Streptomyces sp.* (Figura 21). El árbol diseñado nos permite destacar que se trataría de una nueva especie no reportada hasta la actualidad, pero la incluye dentro del mismo grupo de cepas *Streptomyces* ATTC productoras de metabolitos como *Streptomyces griseus* y *Streptomyces flavogriseus* lo cual nos confirma que este actinomiceto estudiado presenta un elevado potencial biotecnológico como fuente productora de antibióticos de naturaleza peptídica que debe continuar estudiándose.

El proceso fermentativo, a pesar de no tener como objetivo la optimización de parámetros nutricionales y fisicoquímicos, se realizó teniendo en cuenta los resultados preliminares de caracterización bioquímica, fisicoquímica, componentes nutricionales y medios de cultivo adecuado (Anexo 1). Por ello, se eligió un tiempo de 12 días para el crecimiento en agitación, se trabajó con los caldos Marino y ECOLINO 322, dejando de lado al medio TSB, además se

realizó el seguimiento al pH para verificar que los valores no salgan fueran de los rangos establecidos en el punto 7.1 y por lo tanto no pueda inhibirse el crecimiento bacteriano (Anexo 2).

Antes de estudiar la naturaleza de los compuestos antimicrobianos que el actinomiceto 13A-2 está produciendo, es necesario confirmar que estos están presentes en los sobrenadantes, caldo marino y caldo ECOLINO 322, que se están obteniendo en el proceso fermentativo (Anexo 2), es por ello que se evaluó la actividad antimicrobiana de estos compuestos obteniéndose mejores resultados con el caldo ECOLINO 322 el cual fue capaz de causar inhibición tanto a la cepa testigo Gram positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como a la Gram negativa *Escherichia coli* ATCC 25922 lo que no ocurrió con los medios marinos tanto el simple como el compuesto (Figura 22).

Estos resultados primarios nos permitieron elegir al caldo ECOLINO 322 como el medio idóneo para los procesos fermentativos posteriores y por lo tanto hacer las evaluaciones de actividad antimicrobiana contra las cepas β -lactámico-resistentes. En estas evaluaciones se logró inhibir a todas las cepas patógenas con halos de hasta 22 mm para el caso de *E. coli* fenotipo BLEE mientras que la cepa *Proteus sp.* fenotipo ampC presentó menor sensibilidad con halos de 14 mm (Figura 23), esto se debe probablemente a ciertos mecanismos de resistencia antimicrobiana que presenta un microorganismo, como lo demuestran diferentes investigaciones entre las que destaca Pazhanimurugan et al, (2010), quien obtuvo diferentes halos de inhibición, con

14 mm para *Escherichia coli* y 12 mm contra *Pseudomonas aeruginosa* ambas cepas testigo de fenotipo β -lactámico resistentes de origen clínico.

Cabe recalcar que nuestras evaluaciones fueron probadas sólo con sobrenadantes y no extractos crudos como los realizados por los autores antes señalados.

Después de comprobar que los antimicrobianos causantes de la inhibición de las cepas patógenas se encuentran en los sobrenadantes obtenidos a partir del caldo ECOLINO 322 se elaboró una metodología de trabajo para el estudio de la naturaleza de dichos antimicrobianos, para ello se siguió las metodologías utilizadas por algunos autores como *Kanlayani et al.*, (2008), *Himadiri et al.*, (2008) y *Sathiyaseelan et al.*, (2011), en las que no utilizan solventes orgánicos ya que estos pueden afectar la actividad de los antibióticos que se están extrayendo y también se realizó una metodología con la forma convencional, es decir trabajando con solventes orgánicos como la mayoría de autores lo realizan. Por ello el procedimiento fue dividido en 2 partes (A y B), según se indica en el punto 7.7.3. Aquí el primer método (A) fue usando solventes orgánicos y el segundo (B) sin uso de solventes orgánicos, debido a que los solventes orgánicos tienden a denaturar proteínas y mucho más cuando no se realiza la centrifugación y demás procedimientos a temperaturas menores de 4 °C . Esto no quiere decir que no se pueda extraer compuestos antimicrobianos con solventes sino que estos afectan negativamente los compuestos que sean de naturaleza proteica, y mucho más cuando los solventes son más polares, tal como señala *Danji et al.*, (1969), por lo tanto esto puede provocar que la

actividad antimicrobiana no se manifieste, así queda demostrado con los resultados evidenciados en las Figuras 24 y 25, en donde a pesar de trabajar con 6 solventes de diferentes polaridades (polar, polaridad intermedia y no polares) ninguno de estos extractos produjo halos de inhibición, al contrario de lo que ocurrió cuando se evaluaron solo sobrenadantes. Esto nos permitió deducir que los compuestos antimicrobianos presentes eran muy sensibles a los solventes orgánicos y por lo tanto se trataría de compuestos de naturaleza proteica, sospecha que se confirmaría con los resultados del procedimiento B.

Por lo anterior se tuvo que recurrir al segundo procedimiento evitando en todo momento el uso de solventes orgánicos y extrayendo los sobrenadantes con centrifuga refrigerada 4°C. Antes de realizar la cuantificación de proteínas en nuestros sobrenadantes, estos tuvieron que ser evaluados y comparados con algún extracto del punto A, se eligió el extracto con hexano. Esta vez se hizo una evaluación preliminar para conocer en cuál de los 12 días que duró el proceso fermentativo empezaba la producción de antimicrobianos y por ende las zonas de inhibición. Se demostró que dicha inhibición aparece al 5to día de la fermentación e iba aumentando a medida que pasaban los días (Figura 26), este aumento fue considerable cuando se evaluaron los sobrenadantes del 8vo día (Figura 27). La biosíntesis de antimicrobianos fue obtenido después del 4to día de fermentación muy cercano a las 120 horas resultados semejantes a los obtenidos por El-Naggar *et al.*, (2006), quienes obtuvieron un máximo de producción del antibiótico Meroparamycina en tres cepas de *Streptomyces sp.* MAR01 después de 5, 6 y 7 días. También Sousa *et al.*, (2002) demostraron que la producción de D- actinomicina por *Streptomyces parvulus* fue máxima

alrededor de las 144 horas. *Streptomyces albidoflavus* produjo una máxima producción de antibiótico al 8vo día de incubación (Augustine *et al.*, 2005).

De esta manera se confirmó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes y no en los extractos de hexano.

En esta parte de obtención de los sobrenadantes y extractos orgánicos fue muy importante hacer seguimiento del pH durante los 12 días que duró el proceso fermentativo, ya que como indica Shima *et al.*, (1981) la disminución del pH durante el proceso de fermentación es una condición esencial para la acumulación de polímeros con capacidad antibacteriana, teoría que hemos corroborado con el medio ECOLINO 322 y no con el caldo Marino, ya que la acidez del primer medio se hace notoria a partir del segundo día de fermentación hasta el sexto día, mientras que en el caldo Marino el medio se vuelve más básico con valores de pH muy cercanos o mayores a 8 (Tabla 7 y Figura 28).

Srinivasan *et al.*, (2008) obtuvieron resultados con tendencia parecida con una cepa de *Streptomyces californicus*, quién realizó las evaluaciones por 6 días y obtuvo una disminución del pH de 7 a 6 hasta el 2do día para luego elevarse y llegar a pH 8. En cambio Ligia *et al.*, (2010) y Sunga *et al.*, (2008) reportaron cambios muy notorios de pH que se mantuvo durante todo sus procesos fermentativos bajando de 6,8 a 4,2 y de 7,5 a 6 respectivamente.

Estas variaciones pueden deberse a que los autores antes mencionados y al igual que en el presente trabajo, se ha trabajado con medios de cultivo de diferentes composiciones, lo que provocará variaciones considerables de pH

según los nutrientes que estén presentes en dichos medios de cultivo ensayados.

Para la determinación de la cantidad de proteínas en los sobrenadantes con actividad antimicrobiana, 7µg/mL (Tabla 8), la técnica de Qubit fluorometer fue muy importante ya que a diferencia de otras técnicas como Biuret y Bradford, presenta mayor sensibilidad y nos permitió trabajar con soluciones que presentan color lo que no fue posible cuando se realizó con la técnica de Bradford, esta última sí sirvió para evaluar la presencia de proteínas pero solo de forma cualitativa, esta parte fue muy importante para demostrar que los sobrenadantes del 3er día, aquellos que no presentaban actividad antimicrobiana también manifestaron reacción negativa al reactivo de Bradford mientras que aquellos del 5to día, que manifestaron una leve actividad antimicrobiana, también presentaron una leve reacción positiva, pero esta reacción se hizo muy evidente, con un color azul notorio, cuando se evaluó el sobrenadante del 8vo día (Figura 29). Esto nos indicaba que los compuestos de naturaleza peptídica se iban concentrando a medida que los días de fermentación aumentaban coincidentemente con el aumento de la actividad antimicrobiana, por lo tanto se confirmó que los responsables de la actividad antimicrobiana tenían naturaleza proteica.

Posteriormente fue necesario revelar los péptidos antimicrobianos, para ello fue necesaria la realización de la PAGE-SDS, donde se pudo comprobar que nuestros péptidos responsables de la actividad antimicrobiana contra las

bacterias patógenas β -lactámico-resistentes se encontraban con pesos moleculares entre 40 y 50 kD. Aquí se pudo constatar que el calor afectó negativamente la resolución de las proteínas presentes ya que estas no se visualizaron bien (carriles del 2 al 8), lo contrario ocurrió cuando no fueron tratadas con calor (carriles 9 y 10) (Figura 30).

Por lo tanto, al conocer la naturaleza de estos compuestos antimicrobianos y al compararlos con otros estudios donde se han evaluado antimicrobianos de naturaleza peptídica podemos afirmar que los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a la capacidad antagonista del actinomiceto seleccionado, caracterizado e identificado como *Streptomyces sp.* cepa 13A-2, resulta mejor que los obtenidos en otras investigaciones; por ejemplo Asha *et al.*, (2011) logró halos de inhibición de hasta 11 mm contra *K. pneumoniae* ATCC 27736 trabajando solo con sobrenadantes después del proceso fermentativo a concentraciones de 120 $\mu\text{g/ml}$, pues su sospecha de que se trataba de compuestos de naturaleza peptídica le llevaron a evitar el uso de solventes orgánicos, si comparamos sus resultados con los del presente trabajo se puede observar que en nuestras pruebas se lograron halos de hasta 15 mm contra el mismo género de cepa testigo, pero que estos se obtuvieron con concentraciones muy inferiores, pues nuestros sobrenadantes poseen 7 $\mu\text{g/ml}$ (Tabla 8) del principio activo, 17 veces menos concentrada que la de Asha y colaboradores y además, nuestros resultados fueron obtenidos contra cepas de fenotipo β -lactámico resistentes, lo cual demuestra la elevada potencia de nuestros antimicrobianos.

Si comparamos el espectro de actividad de los compuestos entre ambos estudios podemos afirmar que los nuestros inhiben a un mayor rango de cepas Gram negativos ya que además de inhibir bacterias del género *Klebsiella* también es capaz de causar inhibición contra cepas *E.coli* ATCC 25922 así como de fenotipo β -lactámico resistentes, resultados que no pudieron obtener Asha y colaboradores.

Antimicrobianos de naturaleza peptídica producidos por *Streptomyces* también han sido aislados y estudiados por Raja *et al.*, (2012), quienes lograron identificar una proteína producida por una cepa *Streptomyces sp.* aislada de ambientes psicrófilos con actividad contra *E. coli*, cuyo peso molecular fue calculada en 39 KDa, algo cercano a los 45 KDa que presentan las proteínas en nuestro PAGE-SDS.

Ligia *et al.*, (2010) obtuvo halos de inhibición de 8mm, menores a los nuestros, trabajando con péptidos obtenidos de cepas de *Streptomyces* pero de origen terrestre, sus evaluaciones se realizaron mediante técnica de bioautografía directa, es decir concentrando la muestra para depositarla luego en placas de cromatografía de capa fina y finalmente sumergir a la cepa testigo a evaluar y evidenciar halos; ellos lograron estos resultados con concentraciones 10 veces mayores a las nuestras. Ahora, si analizamos el PAGE-SDS de dichos autores se observa que hay proteínas de 40 KDa muy cercanos a los obtenidos en nuestra corrida electroforética. En sus resultados se comprobó actividad contra *E. coli* pero no así contra *Staphylococcus aureus* como sí ocurre en nuestros resultados, lo cual puede estar indicando que dichos antimicrobianos de naturaleza peptídica no tienen el mismo blanco de acción, ya que aquellos

investigadores proponen que sus compuestos actúan a nivel de fosfolípidos de membrana, lo cual es diferente a nuestros resultados ya que nuestro complejo peptídico al poseer naturaleza anfipática, puede interactuar sin dificultades con membranas plasmáticas (Yeaman *et al.*, 2003 & Hancock *et al.*, 1999) y aprovechar esta capacidad para penetrar y actuar a nivel de pared bacteriana, la cual puede ser en primer lugar inhibiendo enzimas esenciales que participan en la formación del peptidoglucano o en segundo lugar rompiendo los enlaces tipo β 1,4 que mantienen unidas al N-acetil-murámico con el N-acetil-glucosamina.

Este planteamiento teórico lo vemos reforzado por el hecho que la inhibición es mayor contra *Staphylococcus aureus* que contra *E. coli* y *Klebsiella* sp. es decir, que afecta en mayor grado a aquellos microorganismos que poseen mayor concentración de peptidoglucano. Se añade también que los microorganismos a los cuales hemos inhibido son β -lactámicos resistentes, es decir poseen naturalmente mecanismos para evadir la respuesta de antibióticos β -lactámicos y por ende son menos sensibles a la acción de nuestros péptidos antimicrobianos, esto se ha demostrado en nuestros resultados ya que nuestros péptidos aunque les han provocado inhibición fue menor en comparación con cepas ATCC. Así pues las cepas *Klebsiella* sp. BLEE y *Proteus* sp. AmpC son menos sensibles en comparación a las cepas de *E.coli* ATCC 25922. Otro resultado que refuerza nuestra teoría es que nuestro complejo antimicrobiano es capaz de degradar la celulosa, polisacárido que también posee enlaces tipo β 1,4 y además dicha actividad coincide exactamente con la actividad antimicrobiana (ANEXO 4), es decir que actúan

recién a las 108 h (cerca al quinto día) con lo cual las posibilidades de que se trate del mismo compuesto que actuó a nivel de enlaces β 1,4 son mayores.

Según los resultados obtenidos por HPLC con detector UV, nuestro antibiótico es un complejo antimicrobiano formado por varios compuestos, al igual como nos reveló PAGE-SDS demostrando que nuestro antimicrobiano está formado por proteínas de entre 40 y 50 KDa.

Se argumenta que estos péptidos son responsables de la inhibición debido a los resultados obtenidos mediante HPLC ya que no aparecen picos en los fermentos de 3 días, día en el que no se detectó proteínas mediante Bradford y además en los fermentos de 3 días tampoco se evidenció actividad antimicrobiana mediante técnica por pocillos (Figuras 26, 27 y 29), pero cuando se realizó la corrida de los caldos con cinco días de fermentación, sí se evidenciaron picos en los cromatogramas, los cuales fueron 5 en total, en los tiempos de 6, 8, 10, 12 y 14 minutos de corrida.

En la evaluación de los fermentos con ocho días aparecieron 4 de los 5 picos en el mismo tiempo de corrida 6, 8, 10 y 14 minutos pero esta vez los picos eran de mayor tamaño lo cual demostraba que su concentración estaba aumentando; el pico del tiempo 12 minutos ya no se encuentra pero aparece un nuevo pico en el tiempo de 5 minutos. A todo esto además debemos agregar que mediante Bradford, (Figura 30), se pudo comprobar que sí había presencia de proteínas tanto en los fermentos de cinco y ocho días, siendo mucho mayor en este último. Esto estaba directamente relacionado con la actividad antimicrobiana ya que la inhibición apareció al 5to día y en adelante se hizo

mayor pues los halos de antagonismo así lo demostraron, siendo mayores después del 8vo día.

Afirmamos que se trata de un complejo antimicrobiano ya que si solo fuera un compuesto el responsable de la actividad antimicrobiana, no hubiesen aumentado los picos en los tiempos 6, 8, 10 y 14 minutos de una manera proporcional y concordantemente con la actividad antimicrobiana, por lo que si hubiese sido sólo un compuesto el causante de la inhibición entonces se hubiese visto aumentado un único pico en los cromatogramas, lo cual no ocurrió. Sin embargo para poder confirmar si la actividad es de uno o varios de los compuestos producidos será necesario fraccionar cada uno de los compuestos encontrados por HPLC y evaluar su actividad antimicrobiana por separado.

Para la obtención de todos estos resultados fue muy conveniente e importante el uso del caldo ECOLINO 322 ya que al ser un medio sin proteínas nos permitió confirmar que todo compuesto peptídico que se formara era producto de la biosíntesis de nuestro actinomiceto *Streptomyces sp.13A-2* (Anexo 2), con lo cual evitamos todo falso positivo que se pudiera haber formado.

Aún falta conocer si este compuesto es sólo proteína o está formado por algunos grupos de diferentes naturalezas; para poder afirmar esto sería necesario un análisis más riguroso, por ejemplo utilizando HPLC acoplado a espectrómetro de masas y también utilizando Resonancia Magnético Nuclear (RMN). Por ahora según los materiales y técnicas utilizadas podemos afirmar que el antibiótico producido por la cepa marina *Streptomyces sp.13A-2* que

inhibió a las 16 bacterias β -lactámico resistentes de origen hospitalario es un complejo antimicrobiano de naturaleza peptídica

A diferencia del trabajo de Ligia *et al.*, 2010 con los resultados obtenidos mediante PAGE-SDS Y HPLC podemos afirmar que nuestro compuesto es un complejo antimicrobiano formado por varios péptidos y no solo uno como ellos concluyeron, esto puede explicar porque nuestro complejo tiene un mayor espectro de acción, inhibiendo a diferentes β -lactámicos resistentes Gram negativos como *E. coli*, *Klebsiella* sp y *Proteus* sp. y también a Gram positivos como *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 aun cuando nuestro compuesto se encuentra a menor concentración. Esto se ve reforzado por Kanlayani *et al.*, (2008) quien obtuvo actividad antimicrobiana, tanto contra Gram positivos y Gram negativos excepto *E.coli*, a partir de sobrenadantes peptídicos (120 μ g/mL)

Pazhanimurugan *et al.*, (2010) lograron obtener halos de 14 y 16 mm, pero no a partir de sobrenadantes sino a partir de extractos crudos y extractos fraccionados respectivamente, contra *E. coli* fenotipo β -lactámicos resistentes. Sin embargo dichos resultados se obtuvieron con concentraciones mayores a las nuestras y además esos compuestos presentaban naturaleza glucosídica y no peptídica como nuestros compuestos.

En la extracción de compuestos usando solventes orgánicos, no se produjeron buenos resultados aun cuando se trabajó con solventes polar, no polar e intermedios. Esto se debe a que los péptidos antimicrobianos poseen naturaleza anfipática (Raja *et al.*, 2012) y en nuestro procedimiento no se

trabajó con mezclas de solventes sino que cada uno se evaluó por separado, lo que pudo afectar el proceso de extracción. Además, para la extracción de este tipo de antimicrobiano se debe considerar mucho la temperatura para evitar en lo posible el efecto desnaturalizador de los solventes hacia los compuestos de naturaleza proteica, debido a que en la presente tesis se trabajó a temperatura ambiente, esto pudo actuar negativamente sobre la actividad de los antimicrobianos, disminuyendo aún más la capacidad de extracción de los solventes orgánicos utilizados. Sin embargo, hay muchos trabajos en donde el uso de solventes ha dado buenos resultados cuando se han extraído y evaluado compuestos antimicrobianos pero hay que aclarar que estos compuestos no son péptidos. Esto depende del tipo de compuesto que se está buscando aislar y por ello es muy importante el uso del solvente o solventes adecuados, por ejemplo, en el trabajo realizado por Vimal *et al.*, (2009) lograron buena actividad antimicrobiana contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10273 y *E. coli* ATCC 25922 con halos de 15 y 20 mm respectivamente, a partir de 1000 µg/ml de extractos obtenidos con éter de petróleo, pero estos resultaron no fueron buenos cuando se evaluaron contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Los solventes orgánicos concentran compuestos de su misma polaridad, dejando de lado aquellos que no son afines afectando los resultados de actividad antimicrobiana final. Timothy *et al.*, (2010) lograron halos de inhibición de hasta 28 mm contra *Proteus vulgaris* CSIR 0030 a concentraciones de 10000 µg/mL con extractos obtenidos a partir de etil acetato, pero no contra *E.*

coli, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 y 4352 respectivamente ni *Staphylococcus aureus* OKOH1.

Debemos resaltar que el estudio de la optimización del proceso fermentativo es de mucha importancia para obtener una mayor producción de antimicrobianos, esto puede servir en próximos evaluaciones para continuar estudiando a la cepa *Streptomyces sp.* 13A-2, ya que como hemos visto, este microorganismo representa un excelente modelo para fines biotecnológicos a posteriori.

Este péptido antimicrobiano producido por el actinomiceto marino *Streptomyces sp.* 13A-2 por su origen marino, buena actividad antibacteriana, amplio espectro y eficacia contra microorganismos patógenos β -lactámicos resistentes nos da indicios de que se trataría de un nuevo compuesto no reportado hasta la actualidad, lo cual es altamente probable según lo fundamentan Fenical, 1993; Jensen & Fenical, 1994; Leiva *et al.*, 2000; Hentschel *et al.*, 2001, quienes aseguran que las posibilidades de encontrar cepas silvestres aún no descritas y que podrían producir nuevos metabolitos secundarios farmacológicamente relevantes son mucho más altas si se estudian de ambientes marinos como se ha descrito y fundamentado en la presente tesis.

9. CONCLUSIONES

- ✓ El actinomiceto marino 13A-2 identificado como *Streptomyces* *sp.* tiene capacidad inhibitoria de bacterias patógenas β -lactámico-resistentes de origen hospitalario.
- ✓ El medio ECOLINO 322 permite una mayor producción y caracterización de compuestos antimicrobianos de naturaleza peptídica por parte de la cepa 13A-2 en comparación a otros medios de cultivo utilizados en el presente estudio y sin necesidad de utilizar solventes orgánicos.
- ✓ El compuesto producido por el actinomiceto marino 13A-2 es un complejo de amplio espectro de naturaleza peptídica cuya actividad antimicrobiana se ve afectada negativamente por los solventes orgánicos utilizados en la presente tesis.
- ✓ Las cepas testigo *Proteus* *sp.* ampC y *Klebsiella* *sp.* BLEE fueron las que mostraron menor sensibilidad a la acción antimicrobiana del actinomiceto 13A-2.

9. RECOMENDACIONES

1. Para optimizar la producción de compuestos antimicrobianos es necesario conocer las características bioquímicas del microorganismo;

- ello nos permitirá conocer los nutrientes que se deben de agregar o quitar en los medios de fermentación.
2. En la búsqueda de nuevos antimicrobianos que no se conozca su naturaleza, primero analizar los sobrenadantes productos de la fermentación, luego la actividad antimicrobiana de estos frente a varios testigos, continuando con HPLC para saber la polaridad de dicho antibiótico; y el uso de solventes debe ser una alternativa. Todo ello, permitirá ahorrar pasos, tiempo y dinero.
 3. Para las pruebas de antagonismo utilizando el método de pocillos frente a cepas testigo como *E. coli* se deben realizar lecturas desde las 12 h de incubación, esto es para evitar falsos negativos y la interferencia de posibles contaminantes.
 4. Para el estudio de la naturaleza proteínica de los compuestos antimicrobianos los caldos de fermentación no deben contener proteínas en su composición, salvo aminoácidos tal como el medio ECOLINO 322. Ello evitará falsos positivos y caracterizar mejor los péptidos antimicrobianos.
 5. Para estudios de antimicrobianos de naturaleza peptídica se debe adoptar medidas de bioseguridad, usar centrifugas refrigeradas, evitar el uso de solventes orgánicos si no se trabaja a menos de 5°C y evitar exponer los sobrenadantes a temperaturas mayores a 30°C.

IX.-REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

.

- Abbas S, Michelle K, Bowling J, Sims J , Waters A. and Mark Hamann. Advancement into the Arctic Region for Bioactive Sponge Secondary Metabolites. Marine. Drugs **2011**, 9, 2423-2437;
- Álvarez S. Evelyn K, “Producción de mRNA para citoquinas hematopoyéticas (IL-3, GM-CSF e IL-7) en ratones inmunosuprimidos tratados con extracto acuoso de *Lepidium meyenii* walpers (maca)” Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en biología molecular Lima, Perú 2013.
- Aponte, U. J; “Potencial antibacteriano de los metabolitos extracelulares producidos por el actinomiceto marino *Streptomyces* M10-77”. Tesis para optar al título profesional de Biólogo Microbiólogo- Parasitólogo”. Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. 2011.
- Augustine, S. K.; Bhavsar, S. P. and Kapadnis, B. P. (2005). A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23; J. Biosci. 30 201–211.
- Altschul SF, Gish W, Miller M, Myes EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J.Mol. Biol. 1990; 215: 403-410.
- Asha G. Nair, D. Selvakumar and K. Dhevendaran, Second street, Park Avenue, Thudiyalur, Coimbatore..Occurrence of Sponges Associated *Streptomyces* and its Antimicrobial Activity Dept of Aquatic Biology and Fisheries, University of Kerala, Kariavattom campus, Thiruvananthapuram-695 007, Kerala, India.World Journal of Fish and Marine Sciences 3 (2): 151-158, 2011 ISSN 2078-4589International Journal of Biomedical and Advance Research 401.

- A.Raja, G.Valarmathi, P.Gajalakshmi and P.Prabakaran.Detection of antimicrobial effect of extracellular protein produced by psychrophilic actinomycetes isolated from manali ice point Ijbar.International Journal of Biomedical and Advance Research (2012) 03(05)
- Bao, K. and S.N. Cohen. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in Streptomyces. Genes Dev. 15:1518-27.
- Barcina, I., Iriberry, J. &Egea, L. (1987) Enumeration, isolation and some physiological properties of Actinomycetes from sea water and sediment. System. Appl. Microbiol. 10, 85-91.
- Bavya M, P. Mohanapriya, R. Pazhanimurugan, R. Balagurunathan. Potencial bioactive compound from marine actinomycetes against biofouling bacteria. Indian Journal of Geo-Marine Sciences. Vol 40(4) August 2011, pp 578-582
- Bibb, M. Regulation of secondary metabolism in Streptomyces. Current opinion in Microbiology.2005, 8:208-215.
- Bibb, M.. The regulation of antibiotic production in Streptomyces coelicolor A3(2). Microbiology 1996. 142:1335-1344.
- Bibb, M. and A. Hesketh. 2009. Chapter 4. Analyzing the regulation of antibiotic production in streptomycetes. Methods Enzymol. 458:93-116.
- Bonar DB, Weiner RM, Colwell RR. Microbial-invertebrate interactions and potential for biotechnology. Microb Ecol. 1986; 12(1): 101-10.
- Bruheim, P.; Sletta, H.; Bibb, M.J.; White, J. and Levine, D.W. (2002). High-yield actinorhodin production in fed-batch culture by a

- Streptomyces lividans strain overexpressing the pathway-specific activator gene actII-ORF4. Norwegian University. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28, 103 – 111.
- Bush,k., Bomer, D., and Sykes.R,B.Izumenolide a novel beta lactamase inhibitor produced by micromonospora. J. Antibiot,33:1262-1269
 - BhagabatiPandey ,PrakashGhimire and Vishwanath Prasad Agrawal. Studies on the antibacterial activity of the Actinomycetes isolated from the Khumbu Region of Nepal
Academician of Royal Nepal.
 - Carfi,A., Pares,S., Duee,E., Galleni,M., Duez,C., Frere,J.M. and Dideberg,O. Characterization and sequence of the Chryseobacterium(Flavobacterium) meningosepticumcarbapenemase: a new molecular class B beta-lactamase showing a broad substrate profile. EMBO J., 14, 4914±4921. (1995).
 - Charnas,R. and Knowles,J. Inhibition of the RTEM -lactamase from Escherichia coli. Interaction of enzyme with derivatives of olivanic acid. Biochemistry, 20: 2732-2737(1981).
 - Chater, K.F. 2001. Regulation of sporulation in Streptomyces coelicolorA3(2): a checkpoint multiplex? CurrOpinMicrobiol. 4:667-673.
 - Chater, K.F. and S. Horinouchi. 2003.Signalling early developmental events in two highly diverged Streptomyces species. MolMicrobiol. 48:9-15.

- Chakraborty, R., J. White, E. Takano and M. Bibb. 1996. Cloning, characterization and disruption of a (p)ppGpp synthetase gene (relA) of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol.* 19:357-368.
- Cragg, G.M. & Newman, D. J. (2001) Medicinals for the millennia - The historical record. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 953, 3-25.
- Danji Fukushima, "Denaturation of Soybean Proteins by Organic Solvents" Central Research Institute, Kikkoman Soyu Co., Nada-shi, Chiba-Ken, Japan. 53rd Annual Meeting, Washington, D.C., April 1969.
- DeLong EF. Archaea in coastal marine environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 5685-5689.
- Dharmaraj, S. & Sumantha, A. Bioactive potencial of *Streptomyces* associated with marine sponges. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009.25: 1971-1979
- El-Naggar, M.Y.; El-Assar, S.A. and Abdul-Gawad, S.M. (2006). Meroparamycin Production by Newly Isolated *Streptomyces* sp. Strain MAR01: Taxonomy, Fermentation Purification and Structural Elucidation. Alexandria University, *The Journal of Microbiology*, 432-438.
- El Shahed, K.; El Dinwany, A. & Awwad, H. Enhanced production of Streptomycin and hydrolytic enzymes by *Streptomyces griseus* strains using different types of organic solvents and detergent compounds. *Indian Journal of Biotechnology.* 2008 Julio Vol 7. 341-348
- Erpicum, T. Granier, B. ; Delcour, M. ; et al. Enzyme production by genetically engineered *Streptomyces* strains: Influence of culture conditions. *Biotechnology and Bioengineering.* 1990. Pçags 719-726.

- Fenical W, Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource, Chem Rev, 93 (1993) 1673-1683.
- Fenical,W.; Jensen, P.; Palladino, M; et al. Discovery and development of the anticancer agent salinosporamide A (NPI-0052) Bioorg Med Chem.2009 Marzo 15; 17(6):2175.
- Fudou, R., Iizuka, T., Sato, A., Ando, T., Shimba, N. & Yamanaka S. (2001) Haliangicin, a novel antifungal metabolite produced by a marine myxobacterium. Isolation and structural elucidation. J. Antibiot. 54, 153-156.
- Ghuysen,J.-M.Serine beta-lactamases and penicillin-binding proteins.Annu. Rev. Microbiol., 45, 37±67(1991) .
- Girones, R., Jofre J.T. & Bosch, A. Isolation of marine bacteria with antiviral properties.
Can. J. Microbiol. 35, 1015-1021. (1989)
- Goshi, K., T. Uchida, A. Lezhava, M.Yamasaki, K. Hiratsu, H. Shinkawa and H. Kinashi. 2002. Cloning and analysis of the telomere and terminal inverted repeat of the linear chromosome of *Streptomyces griseus*. J Bacteriol. 184:3411-5.
- Gotoh, Y., Y. Eguchi, T. Watanabe, S.Okamoto, A. Doi and R. Utsumi. 2010. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. CurrOpinMicrobiol. 13:232-9.
- Groban, E.S., E.J. Clarke, H.M. Salis, S.M.Miller and C.A. Voigt. 2009. Kinetic buffering of cross talk between bacterial two-component sensors. J Mol Biol. 390:380-93.

- Hancock, R.E and Chapple, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1999: 43, 1317–23.
- Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C. & Hacker, J. (2001) Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysinaaerophoba* and *Aplysinacavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 35, 305-312
- HernandezIsara L., Mario L. Macedo, Roberto G.S.Berlinck, Antonio G.Ferreira ,Mirma J. L. Godinho. Dipeptide metabolites from the marine derives bacterium *Streptomyces acrymicini*. *SociedadBrasileira de Química* vol15 , No 3, 441-444,2004.
- Heyduck-Söller, B. & Fisher, U. (2000) Extracellular cyanobacterial substances inhibit microbial growth. *Internatl. Microbiol.* 3, 231-234.
- HimadriMalik, Banani Sur, NehaSinghal&VinodBihari .“Antimicrobial protein from *Streptomyces fulvissimus* inhibitory to methicillin resistant *Staphylococcus aureus*”. Central Drug Research Institute Lucknow 226001, India. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol 46, April 2008,pp 254-257.
- Hodgson, D.A. 2000. Primary metabolism and its control in streptomycetes: a most unusual group of bacteria. *AdvMicrob Physiol.* 42:238-247.
- Hopwood, D.A., F. Malpartida, H.M. Kieser, H. Ikeda, J. Duncan, I. Fujii, B.A Rudd, H.G. Floss and S. Omura. 1985b. Production of 'hybrid' antibiotics by genetic engineering. *Nature*. 314:642-644.

- Hopwood, D. Practical Streptomyces Genetics. 2da Edición. Norwich, England: John Innes Foundation. 2000. ISBN 0-7084-023-8.
- Hopwood, D.A. 1988. The Leeuwenhoek lecture, 1987. Towards an understanding of gene switching in Streptomyces, the basis of sporulation and antibiotic production. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 235:121-138.
- Jensen, P. R. & Fenical, W. (1994). Strategies for the discovery of secondary metabolites from marine bacteria: Ecological perspectives. Ann. Rev. Microbiol. 48, 559-584.
- Jensen PR, Mincer TJ, Williams PG, Fenical W. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonie Van Leeuwenhoek. 2005; 87(1): 43-48.
- Jia, Z., X. Zhang and X. Cao, 2009. Effects of carbon sources on fungal morphology and lovastatin biosynthesis by submerged cultivation of *Aspergillus terreus*. Asia-Pac. J. Chem. Eng., 4: 672–677.
- Kanlayani Charoensopharat, Petcharat Thummabenjapongse, Pisan Sirithorn and Sompong Thammasiriak “Antibacterial substance produced by Streptomyces sp. N^o 87”. African Journal of Biotechnology Vol. 7 (9), pp. 1362-1368, 2 May, 2008.
- Karthik, L. Gaurav, K. V. Bhaskara Rao. Diversity of marine actinomycetes from Nicobar marine sediments and its antifungal activity. Vol 2, Issue 1, 2010.
- Karthy E. S., Ranjitha P., Mohankumar A. (2009). Antimicrobial potential of plant seed extracts against multidrug resistant methicillin resistant

Staphylococcus aureus (MDR-MRSA). *International Journal of Biology* 1(1): 34-40

- Rajeev Kumar Jha and XuZi-Rong. *Review: Biomedical Compounds from Marine Organisms, Marine Drugs* 2004, 2, 123-146
- LAM, K. S. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes. *Current opinion in Microbiology*, V.9, p.245-251, 2006.
- Leiva, S., García-Quintana, H. & Zaror, L. (2000) Actinomycetes acuáticos: una revisión sobre su aislamiento, distribución y potencial antibiótico. *Medio Ambiente.*, 13, 80-8
- Leiva, S., Yañez, M., Zaror, L., *et al.* Actividad antimicrobiana de actinomycetes aislados desde ambientes acuáticos del sur de Chile. *Rev. Méd. Chile* 2004. V.132 n2 Santiago feb.
- León J, Liza L, Soto I, Cuadra D, Patiño L, Zerpa R. 2007. Actinomicetos bioactivos de sedimento marino de la costa central del Peru. *Rev. Per. Biol.* 14(2): 259-270.
- León, J. y P. García-Tello. 1998. Cepas nativas del bacterioneuston marino y su actividad inhibitoria de bacterias ictiopatógenas. *Rev. Per. Biol.* 5 (1): 47 – 64.
- Ligia L. Corrales Gracia; Gelmy L. Ciro G; Péptidos con actividad antimicrobiana producidos por microorganismos nativos. *VITAE, Revista De la Facultad de Química Farmaceútica*. ISSN 0121-4004/ISSNe 2145-2660. Volumen 17 año 2010. Universidad de Antioquia, Medellin, Colombia. Págs.. 181-190.
- Livermore, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8, 557±584(1995)

- Locci, R. 1989. Streptomycetes and Related Genera. *In* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. S.T. Williams, editor, Baltimore. 2451-2508.
- Manteca, A., D. Claessen, C. López-Iglesias and J. Sánchez. 2007. Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. *FEMS Microbiol Lett.* 274:118-25.
- Manteca, A., M. Fernández and J. Sánchez. 2005a. A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. *Microbiology.* 151:3689-97.
- Manteca, A., M. Fernández and J. Sánchez. 2005b. Mycelium development in *Streptomyces antibioticus* ATCC11891 occurs in an orderly pattern which determines multiphase growth curves. *BMC Microbiol.* 5:51.
- Manteca, A. and J. Sánchez. 2009. *Streptomyces* development in colonies and soils. *Appl Environ Microbiol.* 75:2920-4.
- Mannangatti Krishnaraj and Narayanasamy Mathivanan. Diversity of marine actinomycetes in the Bay of Bengal and their antibacterial activity against human pathogens *J. Mar. Biol. Ass. India*, **53** (1) : 135 - 138, January - June 2011.
- Martínez-Antonio, A. and J. Collado-Vides 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 6:482-489.

- Mascher, T., J.D. Helmann and G. Uden.2006. Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *MicrobiolMolBiol Rev.* 70:910-938.
- Mervat M. A. El-Gendy,Usama W. Hamas, Marcel Jaspars .Novel Bioactive metabolites from a marine derived bacterium *Nocardia* sp. ALAA 2000. *J. Antibiotic* 61(6):379-386,2008
- Mohan R., Ramasamy V.Isolation and characterization of marine antagonistic Actinomycetes from west coast of india. *Medicine and Biology* Vol.15, No 1, 2008, pp. 13 - 19
- Mora Cristancho J.A, F. NewmarkUmbreit, M. Santos-Acevedo, J. Sánchez Nieves. Evaluación de extractos de esponjas marinas como nuevas fuentes de sustancias antimicrobianas. *RevEspQuimioter* 2008;21(3):174-179
- Moran, M.A., L.T. Rutherford and R.E.Hodson. 1995. Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S Rrna probe. *Appl Environ Microbiol.* 61:3695-3700.
- Moustafa Y. El Naggar, Maha A. Hassan, and Wafa Y. Said. Isolation and characterization of an antimicrobial substance produced by *Streptomyces violatus*. *Egyptian Journal of Biology*, 2001, Vol. 3; pp 11-21.
- Nagao, T., Adachi, K., Sakai, M., Nishijima, M. & Sano, H. (2001) Novel macrolactins as antibiotic from a marine bacterium. *J. Antibiot.* 54, 333-339.

- Narayana, K. & Vijayalakshmi, M. Chitinase production of *Streptomyces* sp. Anu 6277. Brazilian Journal Of Microbiology. 2009. 40:725-733.
- Nolan R.D, Cross T. (1988) Isolation and screening of actinomycetes. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarsky M, ed. Actinomycetes in biotechnology. San Diego, Calif.: Academic Press Inc: 1-32.
- Oclarit JM, Okada H, Ohta S, Kaminura K, Yamaoka Y, Iizuka T, Miyashiro S, Ikegami S. Anti-bacillus substance in the marine sponge, *Hyatella* species, produced by an associated *Vibrio* species bacterium. US National Library of Medicine National Institutes of Health. Microbios 1994;78(314):7-16.
- Ohnishi, Y., H. Yamazaki, J.Y. Kato, A. Tomono and S. Horinouchi. 2005. AdpA, a central transcriptional regulator in the A-factor regulatory cascade that leads to morphological development and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. Biosci Biotechnol Biochem. 69:431-9.
- Okami, K.; Okazaki, T.; Kitahara, T.; et al. Studies on marine microorganisms : V. A new antibiotic, aplasmomycin, produced by a streptomycete isolated from shallow sea mud. J Antibiot (Tokyo). 1976. Oct;29(10):1019-25
- Osman Mohamed E., Fath Allah H. Ahmed and Walla S. M. 2011. Antibiotic production from local *Streptomyces* isolates from Egyptian soil at Wadai El Natron II: Novel antibiotic Identification produced by *Streptomyces plicatus*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 5(11) : 1906-1910

- Pazhanimurugan, R M. Radhakrishnan and R. Balagurunathan. Bioactive sugar molecule from *Streptomyces aureocirculatus* (Y10) against MRSA, VRSA and ESBL pathogens. *Journal of Pharmacy Research* 2010, 3(9),2180-2181
- Peela; Kurada,B Y Terli, R.2005.Studies on antagonistic marine actinomycetes from Bay of Bengal.*World Journal of Microbiology &Biotechnology* 21:583-585
- Petrosino,J., Rudgers,G., Gilbert,H. and Palzkill,T. J. Contributions of asparagines 49 and phenylalanine 142 residues of tight inhibitory protein of B-lactamases .*Biol. Chem.*, 274, 2394±2400. (1999)
- Reis da Silva Ingrid , Mayra KassawaraMartins, ClariceMaia Carvalho, João Lúcio de Azevedo and Rudi Emerson de Lima Procópio. The Effect of Varying Culture Conditions on the Production of Antibiotics by *Streptomyces* spp., Isolated from the Amazonian Soil. *FermentTechnol* 2012, 1:3
- Rojas R. Carolina. Identificación de genes tipo péptido antimicrobiano provenientes de *Solanum lycopersicum* var. *Cerasiforme* Tesis de maestria en Ciencias Bioquímicas UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE BOGOTÁ Facultad de ciencias-2010
- Ruppert, E.E. y Barnes R.D. 1996. *Zoología de los Invertebrados* (6ª Edición). McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. México. 1114 pp
- Sathiyaseelan K, Stella D. Isolation, identification and Antimicrobial Activity of Marine Actinomycetes Isolated from Parangipettai. Departament of Microbiology, Annamalai University, India. Recent

Research in Science and Technology 2011, 3(9):74-77 ISSN: 2076-5061.

- Selvakumar D, Arun K, Suguna S, Kumar D, Dhevendaran K. Bioactive potential of *Streptomyces* against fish and shellfish pathogens. Iranian Journal of Microbiology Vol 2 numero 3 (septiembre 2010) 157-164.
- Shima S, Sakai H. "Polylysine Produced by *Streptomyces*. Part II . Taxonomy and Fermentation studies. Agro. Biol.Chem. 1981; 45 (11): 2497-2502.
- Smith, C.L., J.G. Econome, A. Schutt, S. Klco and C.R. Cantor. 1987. A physical map of the *Escherichia coli* K12 genome.Science. 236:1448-1453.
- SrinivasanSaisivam, D V R N Bhikshapathi, rishnaveni and V Kishan 2008. Isolation of biorreledin from *Streptomyces californicus* an Indian soil isolate.Indian Journal of Biotechnology Vol. 7 349-355
- Stierle, A.C., Cardelina, H.J. & Singleton, F.L. (1988) A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedaniaignis*. Experientia 44, 1021.
- Sousa, M.F.V.Q.; Lopes, C.E and Pereira, Jr.N. (2002). Development of a bio process for the Production of actinomycin-D. Brazilian Journal of Chemical Engineering pp. 277 – 285.
- Sunga Michelle, Teisan Sy, Tsueng Ginger, MacherlaVenkat, Lam Kin S. " Seawaterrequirement for the production of lipoxazolidinones by marine actinomycete strain NPS8920". J IndMicrobiolBiotechnol (2008) 35: 761-765.

- Timothy Sibanda, Leonard V. Mabinya, Ntsikelelo Mazomba, David A. Akinpelu, Kim Bernard, Ademola O. Olaniran and Anthony I. Okoh. Antibiotic producing potentials of three freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. Int.J.Mol.Sci.11,2612, 2010.ISSN 1422-0067
- Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L. (2001) Microbiology: an introduction. 7th Cummings, San Francisco. 887.
- Thompson, C.J., D. Fink and L.D. Nguyen. 2002. Principles of microbial alchemy: insights from the *Streptomyces coelicolor* genome sequence. Genome Biol. 3:REVIEWS1020.
- Uribe, N., Polette, M., Asenjo, S., Chahuán, E. & García-Quintana, H. G. (1994) Actividad antibiótica de una bacteria marina del litoral de la X Región de Chile. Anal. Microbiol. (Chile) 2, 34-35.
- Van Keulen, G., H.M. Jonkers, D. Claessen, L. Dijkhuizen and H.A. Wosten. 2003. Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. J Bacteriol. 185:1455-1458.
- Vining, L. C. (1990) Functions of secondary metabolites. Ann. Rev. Microbiol. 44, 395-427.
- V. Vimal, Benita Mercy Rajan and K. Kannabiran. Antimicrobial Activity of Marine Actinomycete, *Nocardiopsis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). Asian Journal of Medical Sciences 1(2):57-63, 2009.ISSN:2040-8773
- Yeaman, M.R and Yount, N.Y. "Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance". Pharmacological reviews 2003:55(1), 27–55.
- Yepes García Ana. "Sistemas de dos componentes y regulación de la producción de antibióticos en *Streptomyces coelicolor*" Salamanca,

2010. tesis doctoral -Instituto de microbiología bioquímica departamento de Microbiología y genética c.s.i.c. / UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

- Young, F.E. and W., G.A. 1974. *Bacillus subtilis*. Handbook of genetics. King, R.C.(Ed). New York. 1:69-114.
- Watanabe, T., A. Okada, Y. Gotoh and R.Utsumi. 2008. Inhibitors targeting twocomponent signal transduction. *AdvExp Med Biol*. 631:229-236.
- Westerdahi A., J Olsson, S. Kjelleberg, *etal*. Isolation and caracterización of turbot (*Scophthalmus maximus*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991 57(8):2223-2228
- Walsh, C. (2003). Where will new antibiotics come from?. *Nat. Rev. Microbiol.*, 1: 65-70.
- Wang, Y.H., Y.P. Li, Q. Zhang and X. Zhang, 2008. Enhanced antibiotic activity of *Xenorhabdus nematophila* by médium optimization. *Bioresour. Technol.*, 99: 1708–1715.
- Wanzhi Huang, Zanna Beharry, Zhen Zhang and Timothy Palzkill. A broad-spectrum peptide inhibitor of b-lactamase identi®ed using phage display and peptide arrays *Protein Engineering* vol. 16 no. 11 pp. 853±860, 2003.
- Wolfgang Ludwig , Jean Euzéby and William B. Whitman Phylogenetic trees of the phylum ACTINOBACTERIA Technische Universität Muenchen, Muenchen, Germany, ludwig@mikro.biologie.tu-muenchen.de; École Nationale Vétérinaire de

Toulouse (ENVT), Toulouse, France, euzeby@bacterio.org; University of Georgia, Athens, U.S.A., whitman@uga.edu-2007

- Zheng L, Han X, Chen H, Lin W, Yan X. Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources. Ann Microbiol. 2005;55(2):119-24.
- Zheng ZH, Zeng N and Huang YJ, Detección of antitumor and antimicrobial activities in marine organism associated actinomycetes isolated from the Taiwan strait, China.FEMS Microbial Lett, 188, 2000, 87-91.

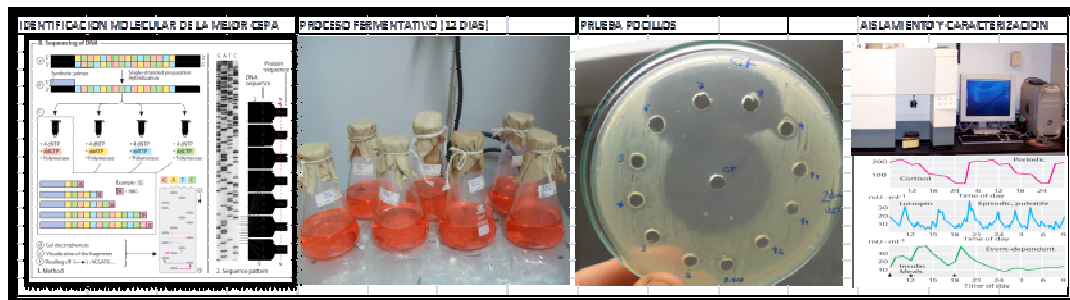
ANEXOS

ANEXO 1

Resumen de la metodología de trabajo.



Procedimiento para el aislamiento, caracterización preliminar y evaluación de la actividad antimicrobiana de un actinomiceto marino.



Procedimiento para la caracterización molecular, proceso fermentativo, obtención, evaluación y caracterización de compuestos antimicrobianos.

ANEXO 2

1. MEDIO MARINO COMERCIAL (g/ L)

• Cloruro de sodio	19.4
• Cloruro de Magnesio	8.8
• Peptona bacteriológica	5
• Sulfato de sodio	3.24
• Cloruro de calcio	1.8
• Extracto de levadura	1
• Cloruro de Potasio	0.55
• Bicarbonato de sodio	0.16
• Citrato férrico	0.1
• Bromuro de potasio	0.08
• Cloruro de Estroncio	0.034
• Ácido bórico	0.022
• Fosfato disódico	0.008
• Silicato de sodio	0.004
• Fluoruro de sodio	0.0024
• Nitrato de amonio	0.0016
• Agar Bacteriológico	15

pH final: 7.2 ± 0.2

2. MEDIO TSA (g/L)

• Tripteína	15.0
• Peptona de soya	5.0
• Cloruro de sodio	5.0
• Agar Bacteriológico	15.0

pH final: 7.3 ± 0.2

3. MEDIO MARINO SIMPLE (g/L)

• Extracto de levadura	1
• Peptona de soya	4
• Agua de mar	750 mL
• Agua destilada	250 mL
• Agar Bacteriológico	15

pH final: 7.3 ± 0.2

4. MEDIO MARINO COMPUESTO

• Extracto de levadura	1
• Peptona de soya	4
• Glucosa	5
• Almidón	10
• Carbonato de calcio	1
• Agua de mar	750 mL
• Agua destilada	250 mL
• Agar Bacteriológico	15

pH final: 7.3 ± 0.2

5. MEDIO ECOLINO 322

- Sales, carbohidratos (*)
- Excipientes y agua de mar (*)
- Agar agar (15g/ L)
- 1 aminoácido.

pH final: 7.3 ± 0.2

* Estos compuestos y sus concentraciones quedan reservados por el autor.

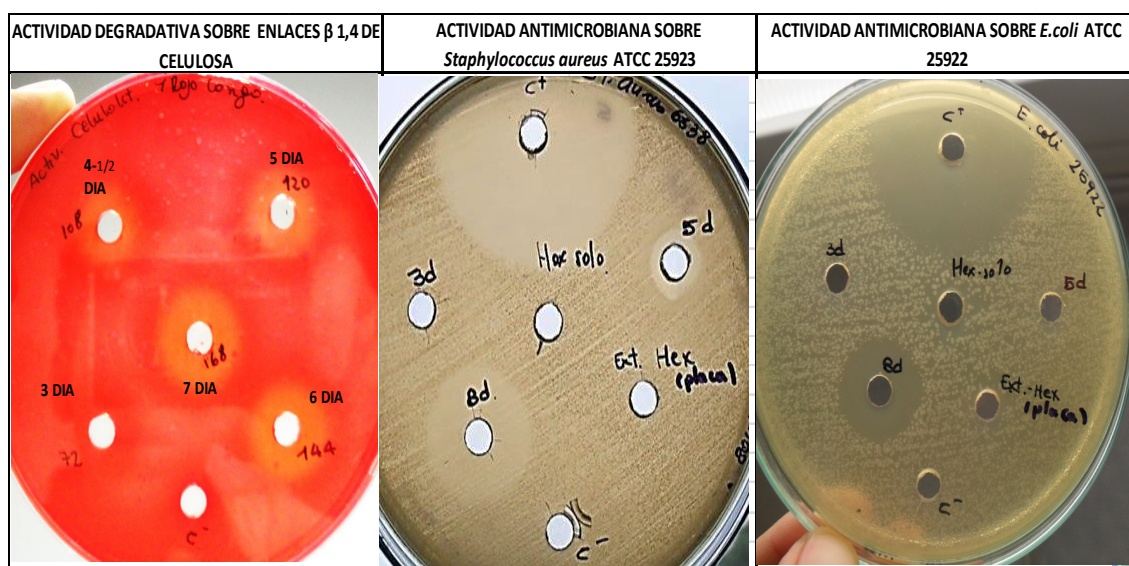
6. MEDIO ECOLINO 322 + EL

- Sales, carbohidratos (*)
- Excipientes y agua de mar (*)
- Agar agar (15g/ L)
- 1 aminoácido
- Extracto de Levadura (EL)

pH final: 7.3 ± 0.2

ANEXO 4

Resumen de la actividad antimicrobiana del actinomiceto 13A-2.



Afinidad por enlaces tipo β 1,4. Actividad catalítica de los sobrenadantes antimicrobianos coincidentemente en el mismo tiempo con la actividad celulolítica. Los números indican los días de los sobrenadantes. Obsérvese que los de 3 días no poseen actividad ni celulolítica ni antimicrobiana, además la actividad antimicrobiana es mayor en Gram positivos como en Gram negativos.

